



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – ECOLOGIA**



**ALINE VIANCELLI**

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ANAMMOX:  
UMA BACTÉRIA CHAVE NO CICLO DO NITROGÊNIO**

**FLORIANÓPOLIS**

**2009**

**ALINE VIANCELLI**

**CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ANAMMOX:  
UMA BACTÉRIA CHAVE NO CICLO DO NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia, sob orientação da Dra. Regina Vasconcellos Antônio e co-orientação do Dr. Airton Kunz.

**FLORIANÓPOLIS**

**2009**

*“Para meus pais Aurélio e Idalina. Paulo Augusto Esteves, meu amigo, meu exemplo. E Roberto Thums. As pessoas mais importantes da minha vida”.*

## **Agradecimentos**

A Deus, pela benção da vida, pela força, pela tranquilidade nos momentos de dificuldade e de angústia. Mas principalmente por colocar pessoas certas em meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais Aurélio e Idalina, pelo amor, dedicação, ensinamentos e apoio total, onde juntos vencemos as adversidades da vida.

Aos meus orientadores Regina V. Antônio e Airton Kunz, pela confiança, força, conselhos, ensinamentos e apoio incondicional. Por acreditarem em mim, por me darem uma oportunidade mesmo sem me conhecer.

Em especial ao meu amigo e exemplo Paulo Augusto Esteves, sem o qual nada disso teria sido possível. Pelo entusiasmo, pelo apoio, pelo exemplo, por ter acreditado em mim e estado ao meu lado desde o primeiro momento, me ensinando não apenas como caminhar pelo ‘mundo científico’, mas pela vida.

À Alessandra D'avila da Silva pelo incentivo, carinho, alegria, simpatia e doçura com que sempre me recebeu.

À Neide L. Simon (Deidi), pela amizade, confiança, ensinamentos, e por ser sempre meu socorro durante o desenvolvimento do trabalho. Por estar sempre pronta a ajudar tanto nos assuntos ‘científicos’ como nos pessoais.

Ao Fernando V. Bauermann por me ensinar que a vida pode ser levada com mais tranquilidade, que os botões foram feitos para ser pressionados, e que quando algo dá errado o melhor que se tem a fazer é analisar o processo, tentar encontrar o erro e repetir o processo, sem correria.

À Heloísa Fernandes, por suas risadas tão boas de ouvir, pelos papos, pelos dias que passamos escrevendo artigos e dissertações, pelos almoços cheios de alegria. Pela amizade sincera, pelo apoio no laboratório, pelas palavras de apoio quando eu ficava chateada por algum erro cometido.

Ao Roberto Thums, meu irmão, amigo, companheiro de todos os momentos, pelo apoio, pelo amor, pelo carinho, por ser meu guia e meu porto seguro sempre. Pelos anos maravilhosos que passamos juntos e que deram sentido à uma importante fase de minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Experimentação e Análise Ambiental Laerte Freisleben, Guilherme Ferrari, Joana De Pra, Ricardo Steinmetz e Cleo Bressan pelo apoio laboratorial, pela amizade e pelo carinho e paciência para sanar minhas dúvidas.

Ao Valmor dos Santos (Nêne), pelo carinho, amizade e prontidão com que realizou seu trabalho essencial para o bom funcionamento dos experimentos.

Aos meus colegas e amigos de mestrado Bruna Borba Dias, Poliana Zooche, Áurea L. Lemes, Mariana P. Ortegui, Fernando de Pol Mayer e ao professor Mauricio Petrucio, pela amizade, carinho, pelo apoio, pelos momentos de descontração que me fizeram muito bem.

Às ‘miguinhas’ Giseli Ritterbusch, Camila Sá Rocha, Kelen Ascoli Baldi, pelo carinho, amizade, companhia, pelas risadas e ‘cachorro na casa da Gi’.

Ao Alexandre Tessmann por todo o apoio no sequenciamento das amostras, por sua amizade, dedicação e prontidão.

À Helo Miot (Lozinha), pelo apoio no laboratório, por sua dedicação e interesse. Por ser essa menina doce e inteligente que terá certamente um futuro brilhante. Por estar ao meu lado em todos os momentos (incluindo férias!!) festejando os resultados positivos e se chateando com os negativos.

Aos meus grandes amigos Alexandre Rafagnin, Jaine A.B. Santana e Willian Ferreira, por todos os momentos de intensa felicidade que passamos juntos.

Aos membros do programa de Pós-graduação em Ecologia, por terem ‘apostado’ em mim, e por todo o aprendizado durante esses meses. Em especial aos professores Benedito Cortês Lopes, Tânia Tarabini Castellani e Karla Z. Schefer por me ensinarem a gostar de um outro lado da ecologia, diferente do que eu costumava trabalhar.

À Embrapa Suínos e Aves, pelo apoio técnico, sem o qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela atenção e pelas sugestões realizadas.

A todos que participaram e acompanharam meu crescimento durante minha ‘vida científica’ o meu muito obrigado!!!

## Índice

1 INTRODUÇÃO .....	12
<a href="#"><u>1.1 Ferramentas de biologia molecular utilizadas na detecção de organismos com atividade ANAMMOX. ....</u></a>	<a href="#"><u>16</u></a>
1.1.1 Clonagem de fragmentos e análise filogenética.....	17
<a href="#"><u>1.2 Bactérias ANAMMOX em ambientes naturais.....</u></a>	<a href="#"><u>19</u></a>
<a href="#"><u>1.3 Objetivos Gerais .....</u></a>	<a href="#"><u>22</u></a>
1.3.1 Objetivos específicos.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
<a href="#"><u>2.1 O bioreator.....</u></a>	<a href="#"><u>23</u></a>
<a href="#"><u>2.2 Métodos analíticos utilizados no acompanhamento do bioreator.....</u></a>	<a href="#"><u>25</u></a>
<a href="#"><u>2.3 Coleta e armazenamento da biomassa bacteriana.....</u></a>	<a href="#"><u>25</u></a>
<a href="#"><u>2.4 Tratamento para extração de material genético e amplificação de 1500 pb da região 16S rRNA.....</u></a>	<a href="#"><u>25</u></a>
<a href="#"><u>2.5 Tratamento para extração de material genético e amplificação de 436 pb da região 16S rRNA.....</u></a>	<a href="#"><u>26</u></a>
2.5.1 Extração do material genético.....	26
2.5.2 Desenho de iniciadores.....	27
2.5.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	27
<a href="#"><u>2.6 Clonagem dos fragmentos amplificados.....</u></a>	<a href="#"><u>27</u></a>
2.6.2 Ligação do fragmento ao vetor.....	29
2.6.3 Transformação em células competentes.....	29
2.6.4 Extração do DNA plasmidial recombinante pelo método alcalino (Sambrook et al. 2001).....	30
Capítulo 1.....	32
<a href="#"><u>Assembléia bacteriana de bioreator anaeróbio de fluxo ascendente com atividade ANAMMOX.....</u></a>	<a href="#"><u>32</u></a>
3 DISCUSSÃO GERAL.....	46
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

ANEXOS.....	55
<a href="#"><u>Anexo 1: Meio de cultura sintético utilizado na alimentação do bioreator.....</u></a>	<a href="#"><u>55</u></a>
<a href="#"><u>Anexo 2: Metodologia utilizada nas análises de compostos nitrogenados presentes no bioreator.....</u></a>	<a href="#"><u>56</u></a>

## Lista de Figuras

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Árvore filogenética baseada no 16S rRNA representando oito das nove espécies de ANAMMOX (KUENEN, 2008).....	13
Figura 2. Representação esquemática da estrutura celular de bactérias com atividade ANAMMOX. Fonte: adaptado de VAN NIFTRIK et al., 2008. ....	13
Figura 4. Representação do vetor pCR ®2.1-TOPO® usado neste estudo. (Fonte: TOPO TA cloning, Invitrogen).....	18
Figura 5. Detecção de organismos com atividade ANAMMOX em ambiente marinho. Fonte: Schmid et al., 2007.....	20
Figura 6: Porcentagem de bactérias ANAMMOX presentes em sedimentos de diferentes profundidades. Fonte: adaptado de Schmid et al., 2007.....	21

### MATERIAL E MÉTODOS

Figura 7: Fluxograma de procedimentos para identificação de bactérias ANAMMOX presentes em bioreator de escala laboratorial. ....	23
Figura 8: A) Esquema de bioreator anaeróbico de fluxo ascendente utilizado nos ensaios de bancada. B) Bioreator utilizado nos ensaios de bancada. ....	24
Figura 9: Biomassa conglomerada coletada do bioreator ANAMMOX. ....	25

### CAPÍTULO 1

Figura 1 A: Padronização de PCR com novos iniciadores. A: marcador 100 pb; B-G amostras com 3ng de DNA; H: controle negativo. B: PCR com diferentes diluições do material genético para testar a sensibilidade dos iniciadores. 1: diluição 10 <sup>-1</sup> ; 2: diluição 10 <sup>-2</sup> ; 3: diluição 10 <sup>-3</sup> ; 4: diluição de 10 <sup>-4</sup> ; 5: diluição 10 <sup>-5</sup> ; M: Marcador molecular 100pb.....	38
Figura 3. Dendograma dos clones GQ850474 e GQ850475 e sequências semelhantes a eles depositadas no GenBank. ....	40
Figura 4. Dendograma das sequências dos clones contendo o gene 16S rRNA e sequências semelhantes depositadas no GenBank. ....	41
Figura 5. Resultado do teste de especificidade dos iniciadores. Teste usando DNA de 10 espécies diferentes de bactérias. 1- Salmonella cholerasuis; 2- Escherichia coli; 3- Proteus mirabilis; 4- Yersinia enterocolitica; 5- Enterococcus faecalis; 6- Enterobacter sp.; 7- Citrobacter freundii; 8- Pseudomonas aeruginosa; 9- Controle negativo; 10- Controle positivo; 11- Marcador molecular 100pb (Promega). ....	42



**Lista de Tabelas**

Tabela 1: Reagentes utilizados no procedimento de ligação vetor-inserto.....	29
Tabela 1. Identificação, sequências com identidade e % de identidade das sequências de 436 pb obtidas no presente estudo. ....	38
Tabela 2. Identificação, sequências com identidade e % de identidade das sequências do gene 16S rRNA obtidas no presente estudo. ....	41
Tabela 3. Teste de especificidade dos iniciadores. Repetições das reações de PCR para cada bactéria. Sinal + significa resultado positivo, enquanto - significa resultado negativo. ....	42

## Resumo

O presente estudo teve como objetivo caracterizar e analisar filogeneticamente bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio (ANAMMOX) coletadas de bioreator de bancada de fluxo ascendente inoculado com lodo aclimatado proveniente de lagoa anaeróbia de um sistema de Lagoas de Tratamento de Dejetos de Suínos e padronizar técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) objetivando amplificação de uma região de 436 pares de base (pb) correspondente a subunidade menor (16S rRNA) do ribossomo de bactérias ANAMMOX. Visando a identificação dos organismos presentes no bioreator, foram utilizadas as técnicas de PCR, clonagem e sequenciamento da região 16S rRNA e dos fragmentos de 436 pb amplificados. Os iniciadores desenvolvidos foram avaliados quanto sua especificidade e limite de detecção. Foram obtidos 29 clones, dos quais 17 carregavam o gene 16S rRNA e 12 carregavam o fragmento de 436 pb. Entre os 17 clones obtidos, três apresentaram 97% de identidade com ANAMMOX *Candidatus* Jettenia asiática e Planctomycete KSU-1, 12 tiveram identidade com *Janthinobacterium* (99%) e dois apresentaram similaridade com clones não cultivados. Dos clones carregando o fragmento de 436 pb, oito apresentaram 96-100% de semelhança com ANAMMOX *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus, Planctomycete KSU-1 e *Candidatus* Jettenia asiatica. Um clone teve 99% de similaridade com *Pseudomonas* sp. e outros três clones apresentaram semelhança com clones não cultivados. Embora os iniciadores tenham amplificado fragmentos genômicos de organismos não-ANAMMOX, o teste de limite de detecção mostrou que com a PCR foi possível amplificar a região alvo usando concentrações extremamente baixas (0,3 ng) de material genético. A utilização de tais ferramentas (extração de material genômico e execução de PCR com os novos iniciadores aqui desenvolvidos) mostrou-se eficiente, econômica e de fácil execução para caracterização de organismos ANAMMOX, abrindo uma gama de oportunidades para ampliar nosso conhecimento sobre estas bactérias e consequentemente melhorar o tratamento de dejetos de suíno.

## Abstract

The present study aimed to characterize and analyze phylogenetically ammonium oxidizing bacteria (ANAMMOX) sampled from an anaerobic up flow reactor inoculated with acclimated sludge from an anaerobic pond of a swine mature treatment system and to standardize a Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifying a region of 436 base pairs (bp) from the smallest ribosomal subunit (16S) of ANAMMOX bacteria. Aiming the identification of the organisms present in the reactor, were used the following techniques: PCR, cloning and sequencing from the 16S rRNA region and the 436 pb fragments amplified. The primers developed were evaluated about its specificity and detection limit. Twenty-nine clones were obtained, from these, 17 caring the 16S rRNA gene and 12 caring the 436 pb fragment. Among the 17 obtained clones, three presented 97% identity with ANAMMOX *Candidatus* Jettenia asiatica and Planctomycete KSU-1, 12 clustered with *Janthinobacterium* (99% identity) and three presented similarity with uncultured clones. Among the clones caring the 436 pb fragment, eight presented 96-100% similarity with ANAMMOX *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus, *Candidatus* Jettenia asiatica and Planctomycete KSU-1. One clone had 99% similarity with *Pseudomonas* sp. and other three clones showed similarity with uncultured clones. However the primer set had amplified fragments from non-ANAMMOX organisms, the detection limit test showed that with PCR here developed, it is possible to amplify the wanted region with too low quantities (0.3 ng) of genomic material. The utilization of such tools (procedure of genomic material extraction and PCR executed with the set of primers here developed) showed to be efficient, economic and easy to execute to ANAMMOX organisms characterization, opening a wide range of opportunities to study and improve swine mature treatment.

## 1 INTRODUÇÃO

Um processo inovador, descoberto acidentalmente há algumas décadas em um bioreator desnitrificante de uma planta de tratamento de esgoto na Holanda e batizado de ANAMMOX, tem sido utilizado na remoção de nitrogênio de efluentes. Quando da descoberta do processo ANAMMOX, o microrganismo responsável pela transformação anaeróbia de amônio era um mistério, até que Strous et al. (1999), identificaram o mesmo como sendo uma bactéria autotrófica do filo *Planctomycetes* (Ordem *Planctomycetales*) do Domínio *Bactéria*.

Desde a descoberta do processo ANAMMOX, ocorreram uma série de mudanças no entendimento do ciclo biológico do nitrogênio e até o momento foram descritos cinco gêneros *Candidatus* e nove espécies de ANAMMOX: *Candidatus* Brocadia anammoxidans (STROUS et al., 1999), *Candidatus* Brocadia fulgida (KARTAL et al., 2004), *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis (PENTON et al., 2006) *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus (KARTAL et al., 2007), *Candidatus* Scalindua brodae, *Candidatus* Scalindua wagneri, *Candidatus* Scalindua sorokinii (SCHMID et al., 2003) *Candidatus* Jettenia asiatica (QUAN et al., 2008) (Figura 1) e *Candidatus* Scalindua arabica (WOEBKEN et al., 2008).

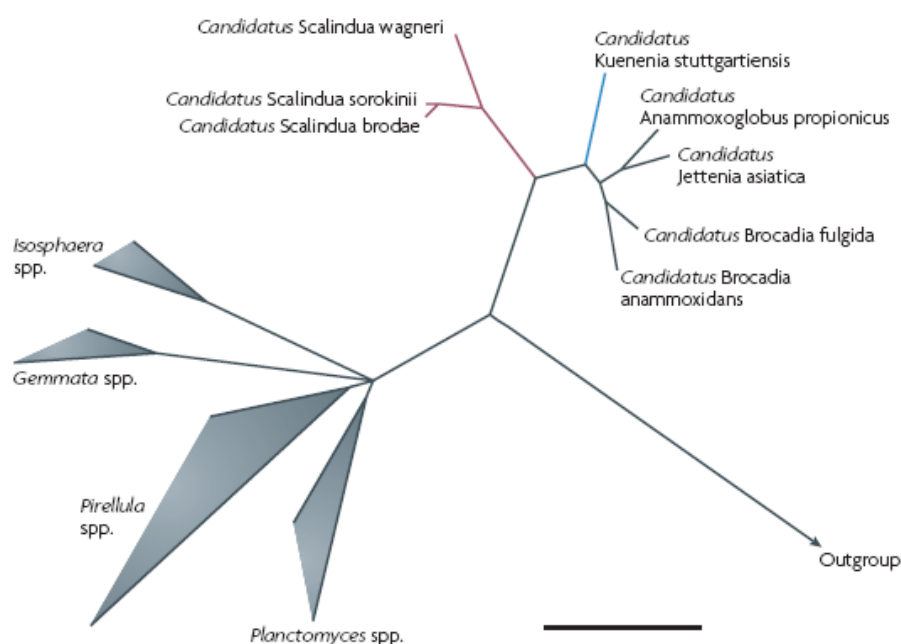


Figura 1. Árvore filogenética baseada no 16S rRNA representando oito das nove espécies de ANAMMOX (KUENEN, 2008).

Destes, *Candidatus* Brocadia anammoxidans, *Candidatus* Brocadia fulgida e *Candidatus* Kuenenia têm sido encontradas em culturas enriquecidas de lodos ativados (STROUS et al., 1999; KARTAL et al., 2004). *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus e *Candidatus* Brocadia fulgida têm mostrado eficiência na oxidação de ácidos orgânicos, como propionato e acetato (KARTAL et al., 2007). Já *Candidatus* Scalindua (KUYPERS et al., 2003), tem sido encontrada em ambiente marinho (PENTON et al., 2006).

Bactérias com atividade ANAMMOX são autotróficas, aderem facilmente a qualquer superfície sólida, não existindo de forma uniforme dentro dos bioreatores (ISAKA et al., 2005). As características ótimas para seu desenvolvimento em um bioreator são pH entre 7 e 8 e temperatura na faixa de 20 a 43° C (JETTEN et al., 1999; TOH et al., 2002). Estudos mostraram ainda, que estas bactérias não têm parede celular com peptideoglicanos como as bactérias gramm-positivas ou gramm-negativas, e sim parede celular proteonácea, como as archeas. A estrutura interna também é incomum, com citoplasma dividido em três compartimentos (Figura 2).

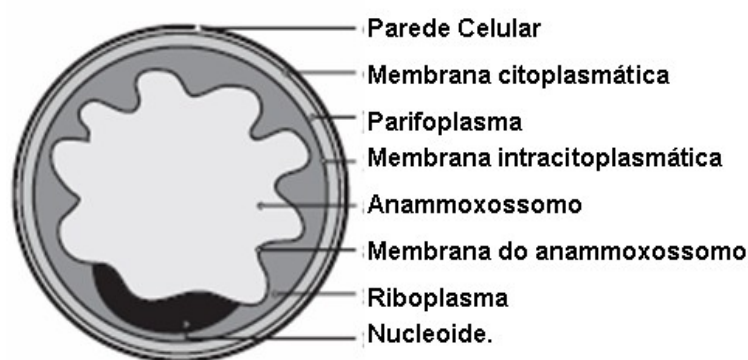


Figura 2. Representação esquemática da estrutura celular de bactérias com atividade ANAMMOX. Fonte: adaptado de VAN NIFTRIK et al., 2008.

O compartimento mais interno, o anammoxossomo, contém partículas de ferro e estruturas semelhantes a tubos (LINDSAY et al., 2001) além de ocupar grande parte da célula (30%). O segundo compartimento citoplasmático, o riboplasma, contém ribossomos e o nucleóide e é circundado pela membrana intracitoplasmática. O terceiro e mais externo compartimento, o parifoplasma, está envolto pela membrana citoplasmática (VAN NIFTRIK et al., 2008).

No ciclo microbiológico do nitrogênio, o processo de nitrificação consiste na conversão de amônio em nitrato pela ação microbiana (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*) e posterior conversão de nitrito a nitrato (*Nitrobacter*). Bactérias com rota completa de desnitrificação catalisam a redução dissimilatoria de nitrato a nitrogênio (YE e THOMAS, 2001). Amonificação é o processo que retorna o nitrogênio incorporado para a forma de amônio (Figura 3A). Dentro do ciclo do nitrogênio, o processo realizado por bactérias ANAMMOX ocorre pela oxidação de amônio a hidroxilamina, a qual é subsequentemente convertida a nitrito (YE e THOMAS, 2001). A Figura 3B indica que em uma primeira etapa o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é reduzido a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ). A hidroxilamina e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são condensados a hidrazina ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) e água, a hidrazina é então oxidada a duas moléculas de gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ). Os elétrons são usados para reduzir a próxima molécula de nitrito.

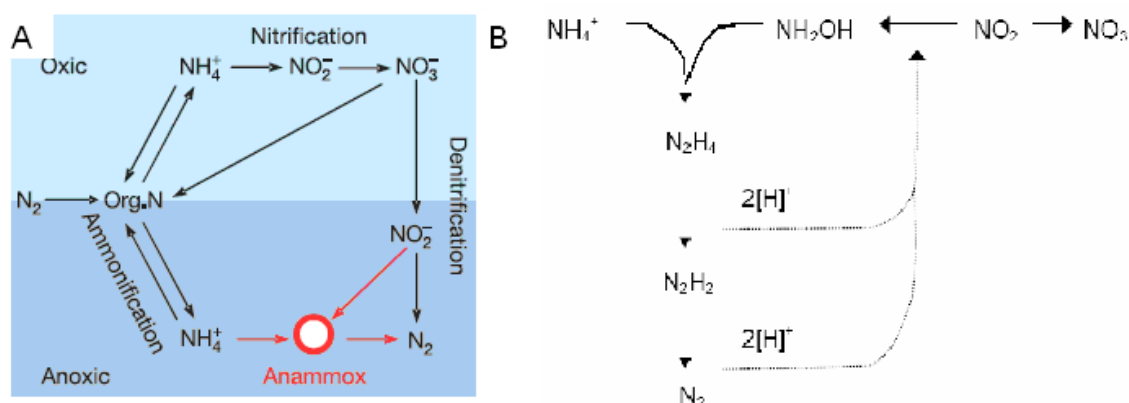


Figura 3. Representação esquemática do ciclo do nitrogênio (A) e da possível rota metabólica para oxidação anaeróbica do amônio (B). (Fonte: van de GRAAF et al., 1996).

Elevadas concentrações de amônio podem ter implicações ecológicas, como influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio dissolvido no meio, uma vez que, para oxidar 1,0 mg de amônio são necessários cerca de 4,3 mg de oxigênio, podendo interferir de forma bastante negativa na comunidade aquática. Além disso, em pH básico o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) se transforma em amônia ( $\text{NH}_3$ ), que, dependendo de sua concentração, pode ser tóxica para estes organismos aquáticos (PRATES, 1997).

A legislação brasileira, através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) resolução nº 357 de 2005, divide em cinco classes a água segundo sua utilização, estabelecendo, nas quatro classes que podem ser utilizada para abastecimento e consumo humano, os limites de 1,0 mg/L e 10,0 mg/L para nitrito e nitrato,

respectivamente. Já para o lançamento de efluentes nos corpos receptores, esta mesma resolução estabelece um limite de lançamento de nitrogênio amoniacal de 20,0 mg/L.

Desta forma, visando atender às legislações pertinentes e, evitar a degradação do meio ambiente, diversas formas de remover nitrogênio dos efluentes têm sido desenvolvidas e aplicadas. Neste ponto, destacam-se os processos biológicos: a nitrificação/ desnitrificação convencional e os novos processos: Sistema de bioreator único para remoção de altas cargas de amônio via nitrito (SHARON), Oxidação anaeróbia de amônio (ANAMMOX), Completa remoção Autotrófica de Nitrogênio através do Nitrito (CANON) e combinações dos mesmos (KHIN e ANNACHHATRE, 2004).

As vantagens do processo ANAMMOX sobre a tradicional combinação de nitrificação e desnitrificação para tratamento de efluentes são a menor demanda de oxigênio e nenhum requerimento de fonte externa de carbono, pois o processo é autotrófico. A desvantagem estaria relacionada a baixa velocidade de crescimento das bactérias ANAMMOX, o que prolongaria o início do processo (EGLI et al., 2001). Por outro lado, esta mesma característica seria responsável pela pequena produção de lodo, uma vez que o tempo estimado de duplicação bacteriana é de 11 dias (JETTEN et al., 2001). Tendo em vista que o aumento do número de bactérias é muito lento, a utilização de bioreatores com um sistema de retenção de biomassa eficiente é necessária para o enriquecimento (SCHMIDT et al., 2002).

Segundo Jetten et al. (2004), o sistema ANAMMOX pode reduzir em até 90% o custo operacional quando comparado à sistemas de nitrificação/desnitrificação convencionais. Desta forma, o processo ANAMMOX é indicado para efluentes com elevadas concentrações de amônio e é capaz de substituir completamente o estágio de desnitrificação, economizar metade dos custos de aeração na etapa de nitrificação e não necessita de adição de carbono orgânico (FUJII et al., 2002).

Uma vez que a taxa de crescimento de bactérias com atividade ANAMMOX é muito baixa (tempo de duplicação de em média 11 dias) (STROUS et al., 1998) técnicas de isolamento em culturas puras não têm obtido sucesso, sendo desta forma necessárias técnicas moleculares para o estudo dessas bactérias e de outras com as quais estejam relacionadas no ambiente (LI et al., 2009).

### *1.1 Ferramentas de biologia molecular utilizadas na detecção de organismos com atividade ANAMMOX.*

Até recentemente, a identificação de microrganismos era baseada em técnicas como Número Mais Provável, microscopia, coloração de Gram, cultivo em placas e isolamento em culturas puras, seguido de múltiplos testes fisiológicos e bioquímicos. No entanto, por serem técnicas seletivas para alguns microrganismos estas se tornam inadequadas para amostras ambientais (AMANN et al., 1995).

Uma alternativa para as lacunas deixadas por essas técnicas, seria o estudo da porção 16S do RNA ribossomal (rRNA) para identificação de bactérias. Há algumas décadas iniciaram-se estudos com a porção 5S do rRNA, no entanto por ser uma região muito pequena (apenas 120 pares de base) não apresentava informações suficientes. Por essa razão optou-se por trabalhar com regiões maiores como o 16S rRNA ou o 23S rRNA (aproximadamente 1500 e 3000 pares de base, respectivamente) que possuem informações suficientes para, por exemplo, possibilitar a realização de comparações e análises filogenéticas (AMANN et al., 1995).

A região 16S rRNA é bem conservada em todas as bactérias, no entanto existem regiões dentro do 16S rRNA que são específicas para cada grupo bacteriano. Por esse motivo esta região tem sido amplamente usada na identificação de grupos bacterianos. Stackebrandt e Goebel (1994) afirmam que sequências com mais de 3% de diferença no 16S rRNA são, na maioria das vezes, de espécies diferentes.

Para a investigação dessas regiões são aplicadas técnicas de extração do material genético total da comunidade e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo que esta última se baseia na replicação *in vitro* do DNA a partir de um DNA molde.

Para a amplificação, o DNA é aquecido a 94°C, onde a dupla hélice é desnaturada permitindo que os iniciadores se anelem à fita simples. O anelamento ocorre com o resfriamento da reação (de 47 a 60°C aproximadamente), onde os iniciadores anelam nas porções complementares da fita, permitindo que com o aumento da temperatura a 72° C, a enzima *Taq* DNA polimerase (em meio contendo os desoxirribonucleotídeos trifosfatados [dNTP] e Cloreto de Magnésio) inicie o processo de replicação (ETCHEBEHERE e MENES, 2005). Após tal procedimento de amplificação o resultado é visualizado através de eletroforese em gel de agarose.



### 1.1.1 Clonagem de fragmentos e análise filogenética

Em decorrência de sua simplicidade e curto tempo de gerar uma nova progênie, a bactéria e, em especial *E. coli*, são os organismos mais estudados em nível celular. Assim, sabe-se que genes bacterianos podem ser transferidos horizontalmente de uma bactéria para outra (ALBERTS et al. 1999). As células bacterianas têm três mecanismos com os quais podem adquirir genes de outras células da população bacteriana: conjugação, transformação e, com a ajuda de vírus, a transdução. A habilidade para tal é conferida por genes contidos nos plasmídeos bacterianos (ALBERTS et al. 1999), os quais são moléculas pequenas, circulares e de DNA dupla fita e que estão separados do cromossomo bacteriano.

Neste trabalho, utilizou-se a transformação como forma de inserir DNA recombinante em células bacterianas. A transformação consiste na capacidade das bactérias de assimilarem pequenos fragmentos de DNA resultantes da morte e degradação de outras bactérias presentes nos arredores. O DNA entra na célula viável e se incorpora ao DNA genômico por recombinação homóloga (ALBERTS et al. 1999).

Plasmídeos são comumente utilizados como vetores de um fragmento de DNA exógeno a ser inserido em outro organismo (Ex: *E. coli*). Assim, cada vez que a célula se multiplica, o número de cópias da molécula de DNA recombinante também duplica (ALBERTS et al., 1999; LEWIN, 2000).

O fragmento de DNA a ser clonado e multiplicado, pode ser isolado e amplificado por PCR e, para facilitar a inserção deste DNA amplificado no vetor, foram desenvolvidos métodos de clonagem usando como estratégia um plasmídeo comercial pCR®2.1-TOPO® TA (Invitrogen®) linear que possui em seus dois sítios terminais uma timidina (T) (KOBBS, 1995; KNOCH, 1999).

O vetor pCR®2.1-TOPO® (Figura 4) contém uma timidina (T) na extremidade 3'. Pelo fato da *Taq* polimerase adicionar deoxirribonucleotídeos adenina (A) nas extremidades 3' dos produtos de PCR, isso faz com que o produto de PCR e o vetor se liguem de maneira eficiente (SHUMAN, 1994).

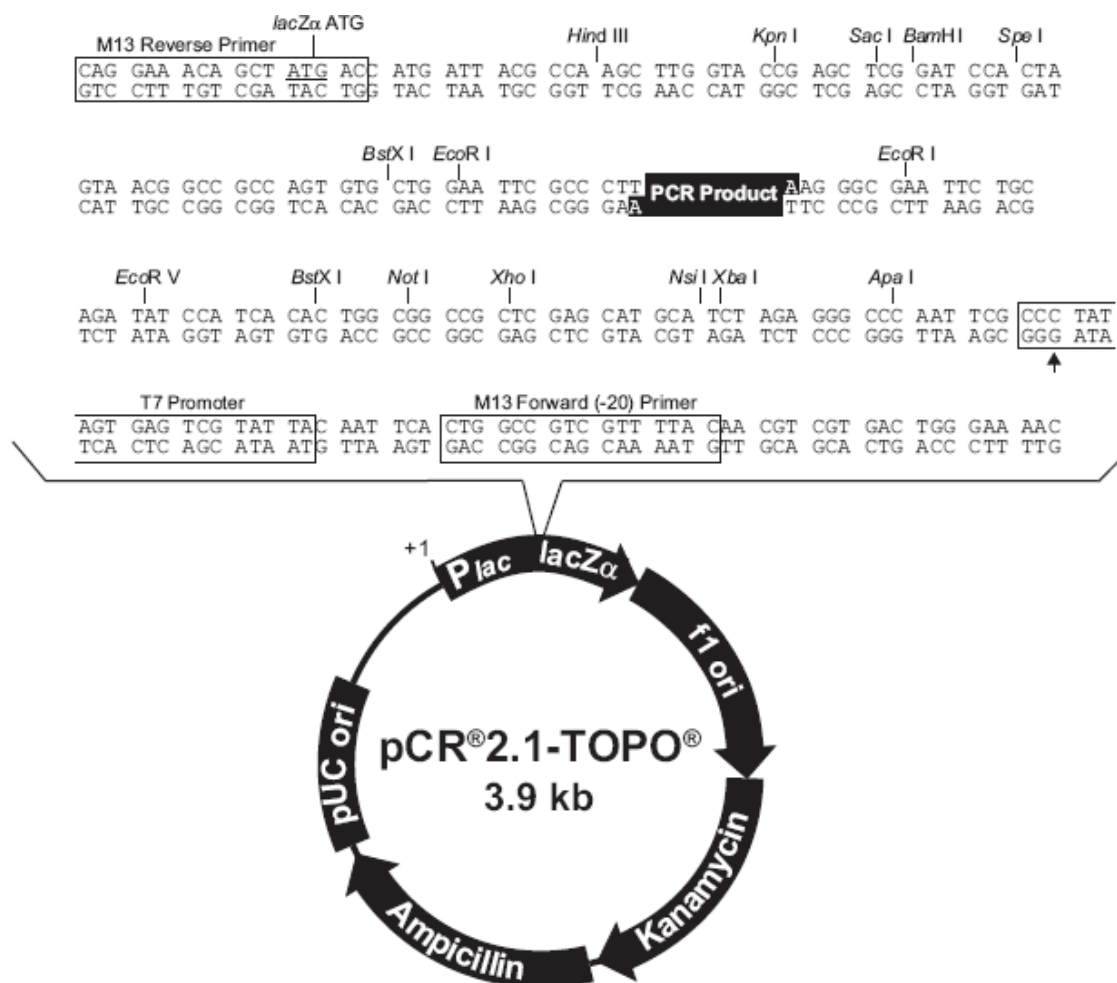


Figura 4. Representação do vetor pCR ®2.1-TOPO® usado neste estudo. (Fonte: TOPO TA cloning, Invitrogen)

Os fragmentos clonados são sequenciados através da metodologia de Terminação de Cadeia que utiliza dideoxirribonucleotídeos (ddNTP) sem o grupo hidroxila (OH) na extremidade 3', isso faz com que ao serem incorporados a extensão da cadeia termine. Além disso, eles são marcados na extremidade 5' com diferentes fluoróforos, permitindo ao sequenciador fazer a leitura dos diferentes ddNTPs. As sequências obtidas são comparadas e com elas são construídos bancos de dados (AMANN, et al., 1995).

Os dados gerados no sequenciamento são primeiramente levados ao programa *Sequence Scanner* (Applied Biosystems) o qual permite visualizar erros nas amostras (falha na reação, sinal baixo, problemas na injeção) e análise da qualidade das mesmas. Após, as sequências de boa qualidade são agrupadas para a formação da sequência consenso através do programa Vector NTI (Invitrogen®).

Posteriormente a formação da sequência consenso, a mesma é submetida ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), contido no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*). O BLAST permite a busca de sequências depositadas neste banco de dados, as quais sejam similares às alinhadas no Vector NTI (KREUZER, 2002).

As sequências são então submetidas ao programa MEGA, o qual oferece ferramentas para analisar sequências de DNA e construir árvores filogenéticas numa perspectiva evolutiva. Quando levadas para o MEGA as sequências são alinhadas progressivamente pelo Clustal W. Neste, as sequências mais similares, ou seja, aquelas com melhores alinhamentos são alinhados primeiro. Então progressivamente grupos mais distantes são alinhados até que se obtenha um alinhamento global (KUMAR et al., 2004).

Em seguida, o método *neighbor-joining* é empregado para criar uma árvore guia, a qual é usada para gerar o alinhamento global. Essa generalidade fornece um resultado próximo do ótimo, especialmente quando o conjunto de dados contém sequências com grau variado de divergência (NEI e KUMAR, 2000). A árvore é construída usando *Boot-strapping*, o qual é realizado para testar a robustez do arranjo filogenético. Isso é feito através de uma amostragem randômica dos nucleotídeos dos múltiplos alinhamentos para construir uma nova árvore (HARRISON e LANGDALE, 2006).

## 1.2 Bactérias ANAMMOX em ambientes naturais

Com a utilização de técnicas moleculares e análise de lipídeos, bactérias com atividade ANAMMOX ativas têm sido encontradas na zona anóxica do Mar Negro (KUYPERS et al., 2003) e zona de oxigênio mínimo de Bengala (KUYPERS et al., 2005). Além disso, bactérias com atividade ANAMMOX tem sido detectadas também em sedimentos costeiros e de estuários (THAMDRUP e DALSGAARD, 2002; TRIMMER et al., 2003; RISGAARD-PETERSEN et al., 2004; ENGSTRÖM et al., 2005) e sedimentos de região polar (RYSGAARD et al., 2004) (Figura 5). Nestes locais, a contribuição de organismos com atividade ANAMMOX para a produção de  $N_2$  é de aproximadamente 60%. O entendimento do papel destes organismos no ciclo global do

nitrogênio ainda é precário, no entanto o conhecimento dos organismos pode ajudar a esclarecer seu papel no ciclo e seu impacto global.



Figura 5. Detecção de organismos com atividade ANAMMOX em ambiente marinho. Fonte: Schmid et al., 2007.

Schmid et al., (2007) investigaram a abundância, diversidade e atividade de bactérias ANAMMOX em diferentes ambientes anóxicos marinhos. O estudo mostrou uma baixa diversidade, sendo encontradas apenas *Candidatus Scalindua*. A Figura 6 mostra os resultados da quantificação de bactérias ANAMMOX pelo método de Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH), onde amostras superficiais (barras brancas) apresentaram menos bactérias ANAMMOX em comparação com amostras profundas (barras cinza), indicando que a porcentagem de bactérias ANAMMOX cresceu com o aumento da profundidade do sedimento. Esse aumento se deve ao fato de esta camada ser anóxica e ter acúmulo de nitrito, o que a torna um ambiente ideal para organismos ANAMMOX.

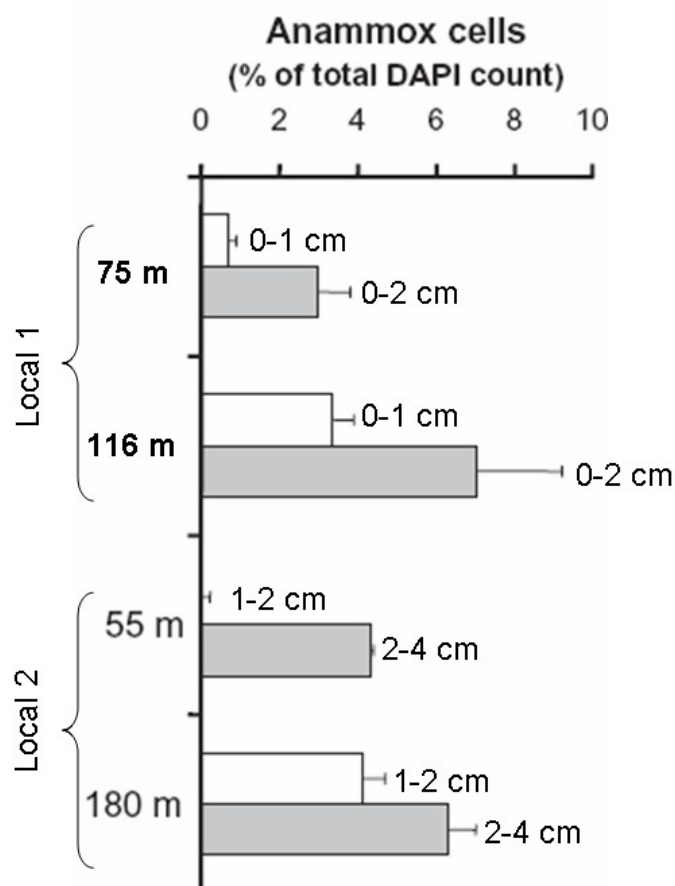


Figura 6: Porcentagem de bactérias ANAMMOX presentes em sedimentos de diferentes profundidades. Fonte: adaptado de Schmid et al., 2007.

No entanto, a grande maioria dos isolamentos tem sido descrita em lodos de sistemas de tratamento de efluente. Desde os primeiros estudos percebeu-se que o processo ANAMMOX tem um grande potencial na remoção de amônio de efluentes. Mesmo apresentando tantas restrições operacionais para o desenvolvimento de um bioreator em escala real, o esforço neste sentido é válido devido às elevadas cargas removidas por este tipo de sistema. Foi assim que, com base nos resultados laboratoriais, se construiu a primeiro bioreator ANAMMOX em escala industrial (com volume de 80 m<sup>3</sup>) para tratar efluentes com altas cargas de amônio (VAN DER STAR et al., 2007). Devido a baixa taxa de crescimento, o *start-up* do bioreator foi de dois anos. Em 2006 o bioreator estava operando em escala total, convertendo de 8 a 10 kgN/m<sup>3</sup> diariamente, esta performance estava duas vezes acima do esperado quando da idealização do bioreator.

Desde sua descoberta, bactérias ANAMMOX têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa espalhados pelo mundo. No Brasil, há alguns grupos trabalhando com bactérias ANAMMOX, sendo que, Schierholt Neto et al. (2007) desenvolveram um bioreator anaeróbio de fluxo ascendente e aclimataram uma flora de microrganismos oxidadores anaeróbios de amônia utilizando inóculo proveniente do fundo de uma lagoa experimental de um sistema de tratamento de dejetos de suíno, localizada na Unidade Demonstrativa (UD) da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

A partir do dia 75 (19/12/2006) após a inoculação, o bioreator apresentou atividade ANAMMOX, no entanto o microrganismo responsável por esse processo não era conhecido. Essa foi a motivação do presente estudo, que objetivou caracterizar e analisar filogeneticamente bactérias oxidadoras de amônio presentes em bioreator anaeróbio de fluxo ascendente com atividade ANAMMOX.

### *1.3 Objetivos Gerais*

- Caracterizar e analisar filogeneticamente bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio (ANAMMOX) coletadas de um bioreator anaeróbio de fluxo ascendente inoculado com lodo aclimatado proveniente de lagoa anaeróbia de um sistema de tratamento de dejetos de suínos.

#### *1.3.1 Objetivos específicos*

1. Amplificar, clonar e sequenciar a região 16S rRNA de bactérias presentes em bioreator de bancada de fluxo ascendente com atividade ANAMMOX.
2. Padronizar uma PCR amplificando um fragmento de 436 pb do gene 16S rRNA de bactérias presentes em bioreator de bancada de fluxo ascendente com atividade ANAMMOX.
3. Desenhar iniciadores para amplificação de fragmento de 436 pb.
4. Testar os novos iniciadores quanto a sua especificidade e limite de detecção.
5. Clonar os fragmentos amplificados, bem como o gene 16S rRNA.
6. Sequenciar os clones obtidos.
7. Analisar as sequências obtidas utilizando ferramentas de bioinformática.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

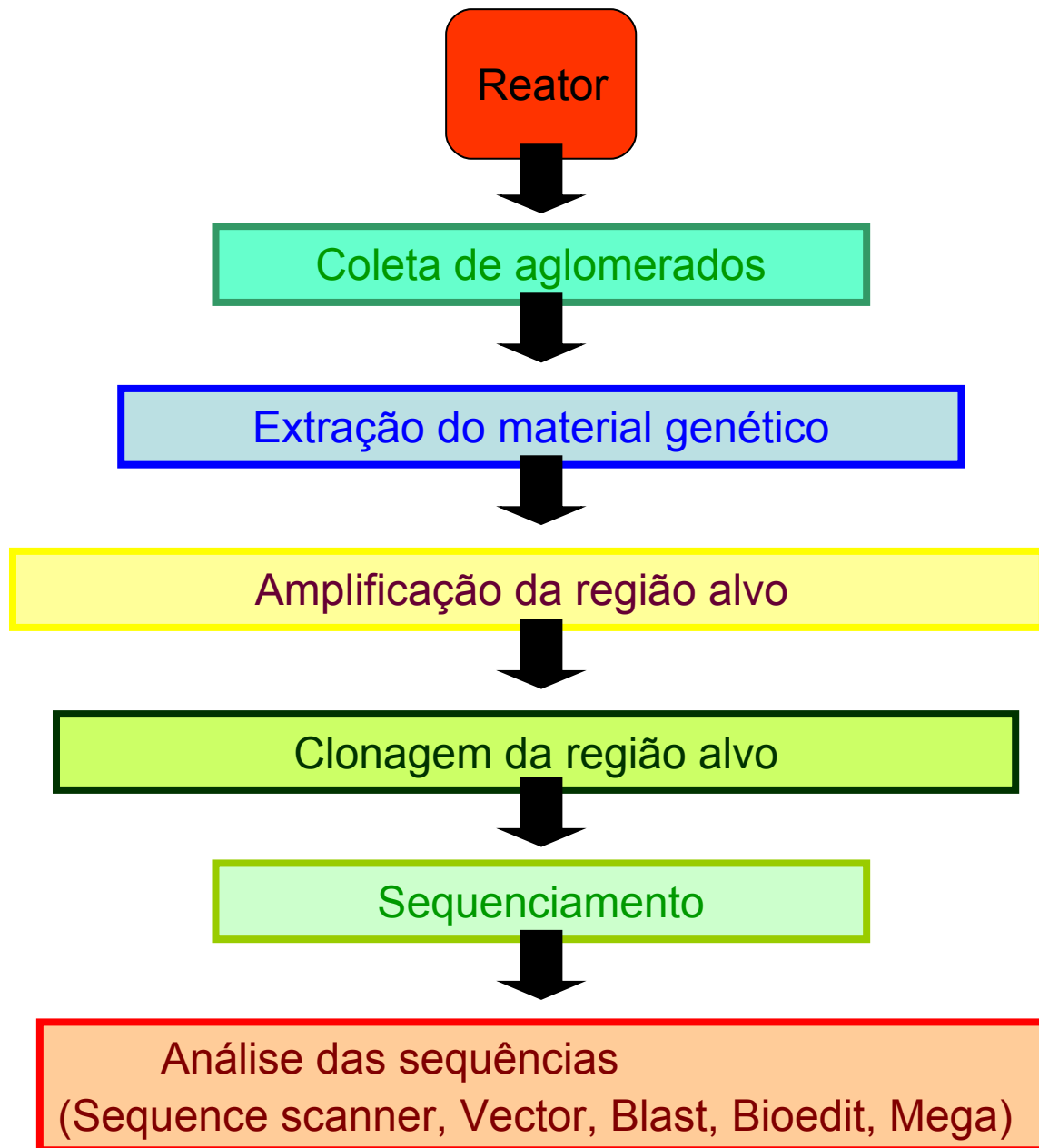


Figura 7: Fluxograma de procedimentos para identificação de bactérias ANAMMOX presentes em bioreator de escala laboratorial.

### 2.1 O bioreator

O bioreator anaeróbio de fluxo ascendente, de onde foram coletadas as amostras analisadas neste estudo, desenvolvido por Schierhold Neto (2007), era cilíndrico, com volume útil de 2L e recheado pelo material suporte composto por polímero não

biodegradável, formando uma rede nas dimensões de 30 x 40 cm. O bioreator esteve disposto dentro de um banho-maria, equipado com aquecedor, termostato e motobomba submersa para homogeneizar a água de aquecimento. A temperatura do bioreator foi controlada através de banho-maria, onde a água é mantida em  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 8).

O meio de cultura foi armazenado em recipientes de PVC, totalmente vedados, sendo sua tampa perfurada para passar as mangueiras de alimentação. O bioreator foi alimentado com o meio de cultura, através de um tubo ligando o reservatório de meio de cultura a um tubo de vidro, o qual passa pelo centro até o fundo do bioreator, promovendo um fluxo contínuo e ascendente, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex 77120-62 de dois canais).

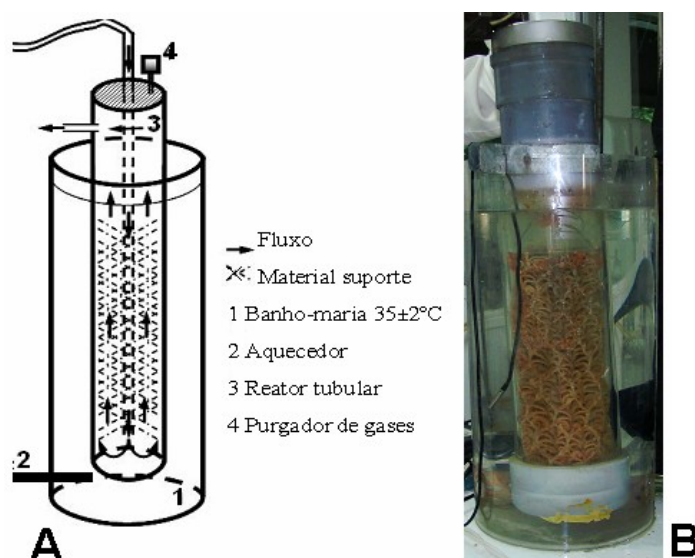


Figura 8: A) Esquema de bioreator anaeróbico de fluxo ascendente utilizado nos ensaios de bancada. B) Bioreator utilizado nos ensaios de bancada.

Schierhold Neto et al. (2007) inocularam o bioreator com lodo do fundo de uma lagoa anaeróbia de um sistema experimental de lagoas de tratamento de dejetos suínos, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Suínos e Aves), Concórdia, SC, Brasil. O bioreator foi alimentado com meio de cultura sintético (Anexo 1), no qual continha nitrogênio nas formas 50% de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ -N) e os outros 50% amônio ( $\text{NH}_4^+$ -N), e mantido em pH 8.0 (Schierhold Neto et al., 2006). O bioreator foi acompanhado através de análise de  $\text{NH}_4^+$ -N, feita pelo método de destilação e titulação (método 4500- $\text{NH}_3$ -B, segundo APHA, 1995).  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  determinados por Sistema de Análise de injeção em fluxo FIALab 2500, FIALab Instruments, com sistema de detecção espectrofotométrica, provido de fonte luminosa "LED" de tungstênio-halogênio (400 to



700 nm), fibra ótica 200 mm e detector UV/VIS USB4000 (Ocean Optics) (Schierhold Neto et al., 2006). Foram necessários 75 dias até o lodo imobilizado começar a desenvolver atividade ANAMMOX (Schierhold Neto et al., 2006).

## *2.2 Métodos analíticos utilizados no acompanhamento do bioreator*

Os dados de acompanhamento do desenvolvimento do processo ANAMMOX estão relatados em Schierhold Neto (2007), o qual realizou análises de nitrogênio na forma de nitrato, nitrito e íon amônio e alcalinidade total seguindo metodologia padrão descrita por APHA (1995), modificado segundo Schierhold Neto et al., (2006) (Anexo 2).

## *2.3 Coleta e armazenamento da biomassa bacteriana*

Para a realização dos experimentos apresentados neste trabalho, foram coletadas duas amostras de aglomerados vermelhos (0,01 g, Figura 9) do bioreator anaeróbico de fluxo ascendente em dois dias de operação distintos. Nos dias 292 e 500 de operação do bioreator e acondicionados em microtubos contendo 50% de meio de cultura próprio para bactérias ANAMMOX e 50% de glicerol (diluído a 60%). Posteriormente, foram mergulhadas por três minutos em nitrogênio líquido e então mantidas sob congelamento a -80 °C até processamento.

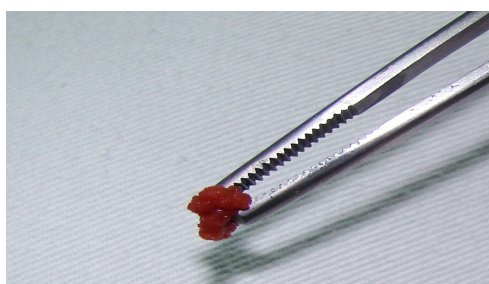


Figura 9: Biomassa conglomerada coletada do bioreator ANAMMOX.

## *2.4 Tratamento para extração de material genético e amplificação de 1500 pb da região 16S rRNA*

A fração de biomassa coletada no dia 500 de operação do bioreator, foi macerada, eluída com água ultra pura e aplicada em cartão tipo FTA (Whatman

Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Após a eluição, o material foi tratado duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (96:4). Após a extração, o material genético foi precipitado com etanol absoluto a -20 °C durante 18 horas, posteriormente o material foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C durante 20 minutos, desprezando-se o etanol absoluto, o DNA lavado com etanol 70%. Finalmente, foi realizada a ressuspensão do material genético em 30 µL de água ultra pura e estocado a -80 °C até o momento de uso.

A amplificação da região 16S rRNA foi executada com o kit comercial KOD -plus- DNA polymerase (TOYOBO, Osaka) usando iniciadores para região conservada de eubactérias 6F (direto: 5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3') (TCHELET et al., 1999) e 1492R (reverso: ACCTTGTTACGACT-3') (LANE, 1991). A PCR foi executada nos seguintes parâmetros: 2 min de desnaturação inicial a 94 °C, 25 ciclos de (15 seg a 94 °C, 30 seg a 58 °C e 30 seg a 68 °C). O material amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Brometo de Etídio para visualização do fragmento sob luz ultravioleta.

Após a visualização, os fragmentos de 1500 pb amplificados foram purificados com kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) e inseridos no sítio HincII do pBluescript II KS+ (Stratagene, USA), e posteriormente transformados em *Escherichia coli* DH10B.

## *2.5 Tratamento para extração de material genético e amplificação de 436 pb da região 16S rRNA*

### *2.5.1 Extração do material genético*

A amostra coletada no dia 292 de operação foi submetida à extração do material genético pelo método de choque-térmico (LEÃO et al., 1999), onde 400 µL de TE/TRITON 1% (10mM de Tris-EDTA pH 8.0, 1% de TRITON 100X) foram adicionados a 0,01 g da biomassa a ser processada. Seguiram-se três ciclos (10 minutos cada) alternados de fervura e congelamento (LEÃO et al., 1999).

### *2.5.2 Desenho de iniciadores*

Para amplificação da região-alvo com 436 pb, foram desenvolvidos um iniciador direto 436F (5'–AGCGGTGAAATGCG–3') e um iniciador reverso 436R (5'–GGGTTTCGCTCGTTA–3') amplificando um fragmento compreendido entre os nucleotídeos 677-1112 da região 16S-rRNA, tendo como base para seu desenvolvimento a sequência de nucleotídeos de *Candidatus* Brocadia anammoxidans depositada no GenBank sob número AF375994.

### 2.5.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Para o desenvolvimento da PCR foram variadas as concentrações de Cloreto de Magnésio (Invitrogen®) de 1,0 a 3,0 mM e temperatura de anelamento dos iniciadores (de 50 a 60 °C). As demais condições foram: 10 pmol de cada iniciador, 2.5 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen®), 10% de tampão 10X (Invitrogen®), 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatos (Invitrogen®), 3 ng do material genético a ser testado e água ultra pura completando um volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram executadas em termociclador (Mastercycler Eppendorf) sob as seguintes condições: 95 °C por 3 min; 30 ciclos (desnaturação a 95 °C por 45 seg, anelamento (teste de 47 a 60°C) por 1 min, extensão a 72°C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio (5 µg/mL; Sigma), e posteriormente visualizados sob luz UV.

Os fragmentos de 436 bp amplificados foram purificados utilizando-se o kit de purificação GFX PCR and Gel DNA purification kit (GE Healthcare, Giles, United Kingdom) conforme instruções do fabricante, os produtos purificados foram ligados em plasmídeo de clonagem pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen) e posteriormente transformados em células competentes *E. coli* DH5α (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

### 2.6 Clonagem dos fragmentos amplificados

O processo de clonagem de fragmentos amplificados por PCR consiste de ligação do fragmento ao vetor, transformação em células competentes e extração do DNA plasmidial (Figura 10).

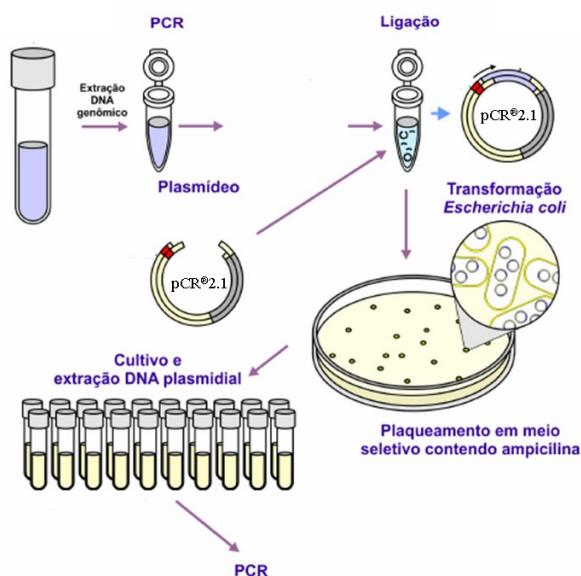


Figura 10. Ilustração esquemática do procedimento de clonagem de fragmentos de DNA de interesse. Fonte: Adaptado de Bressan, 2007.

#### 2.6.1 Preparo de células competentes *Escherichia coli* com cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) - adaptado de Sambrook e Russel, 2001.

As bactérias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> armazenadas em glicerol a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram semeadas por esgotamento em meio agar Luria Bertani (LB) sem antibióticos e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Foram transferidas de 4 a 5 colônias isoladas de *E. coli* para um tubo contendo 1 mL de meio LB (Tryptona, extrato de levedura, cloreto de sódio) líquido sem antibióticos, que foi homogeneizado com o auxílio de “Vortex” em velocidade moderada para dispersar as bactérias. O conteúdo do tubo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB sem antibiótico e incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 horas sob agitação constante de 200 rpm (rotação por minuto) até que atingisse uma densidade óptica (DO), medida em espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 600 nanômetros (DO<sub>600</sub>), de 0,4 – 0,6. Foi adicionado 50 mL de meio LB pré-aquecido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  sem antibióticos e novamente a cultura foi incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante de 200 rpm até que o crescimento bacteriano atingisse uma DO<sub>600</sub> de 0,6 (cerca de 30 minutos de incubação).

Os cultivos de 100 mL do crescimento bacteriano foram mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado celular foi ressuspensionado em 50 mL de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) 100 mM gelado. Posteriormente, as células foram centrifugadas (2500 rpm por 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi descartado, o precipitado celular foi ressuspensionado em 25 mL de  $\text{MgCl}_2$  100 mM gelado e novamente centrifugado, conforme já descrito acima. Descartou-se, então, o sobrenadante e o precipitado foi gentilmente ressuspensionado em 5 mL de  $\text{MgCl}_2$  100 mM gelado e incubado em banho de gelo durante 15 minutos. Adicionou-se, lentamente gota-a-gota, 2,5 mL de glicerol 70% estéril gelado, sob agitação constante do frasco em banho de gelo. As células foram transferidas para criotubos (200  $\mu\text{L}$ /criotubo) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as ampolas com as células foram estocadas a  $-70^\circ\text{C}$ .

## 2.6.2 Ligação do fragmento ao vetor

Os fragmentos de 436pb amplificados e purificados foram ligados ao plasmídeo de clonagem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen). As reações foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Foram feitas ao todo quatro ligações (Tabela 1):

Tabela 1: Reagentes utilizados no procedimento de ligação vetor-inserto.

Lig	DNA	Vetor TOPO	Sal	H <sub>2</sub> O	Total
1	0,5 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	3,5 $\mu\text{L}$	6,0 $\mu\text{L}$
2	0,5 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	3,5 $\mu\text{L}$	6,0 $\mu\text{L}$
3	1,0 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	3,0 $\mu\text{L}$	6,0 $\mu\text{L}$
4	1,0 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	1,0 $\mu\text{L}$	3,0 $\mu\text{L}$	6,0 $\mu\text{L}$

## 2.6.3 Transformação em células competentes

Um volume de 2,0  $\mu\text{L}$  da ligação foi adicionado a 100  $\mu\text{L}$  de células competentes *E. coli* DH5 $\alpha^{\text{TM}}$ . As transformações foram mantidas em banho de gelo durante 30 minutos. Um choque térmico foi realizado durante 30 segundos em banho-maria a 42 °C, seguindo nova incubação em banho de gelo durante dois minutos.

Posteriormente, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de meio SOC (glicose, magnésio, triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, cloreto de potássio) às células transformantes contendo a ligação, e os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm durante 1 hora e 30 minutos. Após a incubação, 100  $\mu\text{L}$  de cada

transformação inserto/vetor foram diretamente plaqueadas em agar LB com ampicilina e (concentração final 50 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 21 horas.

Colônias crescidas isoladamente foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio LB com ampicilina (concentração final 50 µg/mL). A incubação foi conduzida a 37 °C sob agitação (200 rpm) durante 18 horas.

#### 2.6.4 Extração do DNA plasmidial recombinante pelo método alcalino (Sambrook et al. 2001).

Dos tubos com crescimento bacteriano foram separados 1,5 mL o qual foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado celular foi ressuspenso com 100 µL da Solução I (Glicose 2M, Tris – HCl 1M, pH 8.0, EDTA 0,5M pH 8.0) gelado (4 a 10 °C) e posteriormente acrescentou-se 200 µL da Solução II (NaOH 10N, SDS 10%). O conteúdo do tubo foi homogeneizado cuidadosamente invertendo-se o tubo 5 a 6 vezes. Em seguida, foram adicionados 150 µL da Solução III (Acetato de potássio 5M, Ácido acético glacial) gelada (4 a 10 °C) sendo os tubos invertidos 3 a 5 vezes com cuidado para não romper o lisado. Os tubos foram então incubados no gelo por 5 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado em tubos limpos e o DNA plasmidial foi extraído com 220 µL de fenol e 220 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados com “Vortex” por 20 segundos e novamente centrifugados 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. A fase superior foi recuperada em tubos novos estéreis e então precipitada com 900 µL de etanol absoluto na temperatura ambiente. Os tubos foram homogeneizados com “Vortex”, incubados por 2 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Os “*pellet*” foram lavados com 1 mL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados com “Vortex” e centrifugados 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O etanol foi descartado, o “*pellet*” desidratado à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de TE (pH 8,0) com RNase (USB) (20 µg/mL). As amostras de DNA em suspensão foram incubadas a 37 °C por 10 minutos e agitadas no “Vortex”, para produzir uma suspensão homogênea de DNA. Em seguida, as mesmas foram incubadas em temperatura ambiente e finalmente armazenadas a –20 °C. Uma alíquota de 4 µL foi separada para ser testada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão

TAE (Tris, acetato, EDTA) conforme descrito anteriormente. O DNA plasmidial extraído foi submetido a reação de PCR para confirmação da presença do inserto.

### 2.7 Sequenciamento e análise das sequências

Plasmídeos contendo o gene amplificado foram sequenciados através do equipamento 3130xl genetic analyzer e da metodologia BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) segundo orientações do fabricante.

A qualidade das sequências foi avaliada com o programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems), sequências consenso foram criadas usando programa Vector NTI (Invitrogen) e alinhadas utilizando-se o programa ClustalW versão 1.83 (THOMPSON et al., 1994) que é parte integrante do pacote do programa BioEdit versão 7.0.5 (HALL, 1999). As sequências foram comparadas a sequências depositadas no GenBank. As análises comparativas foram executadas através da utilização do *software* MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004).

### 2.8 Teste de especificidade e limite de detecção dos iniciadores desenhados

Para o teste de especificidade, oito bactérias de diferentes espécies foram submetidos às mesmas condições estabelecidas para a PCR, visando a amplificação de um fragmento de 436 pb do 16S rRNA. As seguintes bactérias foram usadas: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Enterococos faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica*. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio (5 µg/mL; Sigma), e posteriormente visualizado sob luz UV, utilizando-se um transiluminador. Como controle positivo foi utilizado amostra anteriormente positiva para bactérias ANAMMOX contendo 3 ng de material genético.

Já para o teste de sensibilidade da reação de PCR, uma amostra do material genético de concentração conhecida (3ng) foi diluído ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ) e cada diluição foi submetida às condições da PCR acima citada. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio (5 µg/mL; Sigma), e posteriormente visualizado sob luz UV, utilizando-se um transiluminador.

## **Capítulo 1**

### **Assembléia bacteriana de bioreator anaeróbio de fluxo ascendente com atividade ANAMMOX**

Versão em português de artigo em fase de redação.



## **Assembléia bacteriana de bioreator anaeróbio de fluxo ascendente com atividade ANAMMOX**

### **Resumo**

O presente estudo trata da descrição qualitativa da assembléia bacteriana com atividade ANAMMOX presente em bioreator anaeróbio de fluxo ascendente inoculado com lodo aclimatado proveniente de lagoas de tratamento de dejetos suínos. A caracterização se deu por dois procedimentos: i) a amplificação do gene 16S rRNA e ii) a amplificação uma região de 436 pb do 16S rRNA, este último pelo desenvolvimento de novos iniciadores e padronização de PCR. Os fragmentos amplificados em ambas os procedimentos foram sequenciados e analisados filogeneticamente. A PCR com os novos iniciadores foi padronizada e testada para limite de detecção e especificidade. A partir da amplificação do gene 16S rRNA, foram obtidos 17 clones. Entre estes 17 clones, três apresentaram 97% de identidade com ANAMMOX *Candidatus* Jettenia asiatica, 12 tiveram identidade com *Janthinobacterium* (99%) e dois clones mostraram similaridade com clones não cultivados. Enquanto que a partir da amplificação da região de 436 pb, foram obtidos 12 clones, dos quais oito apresentaram 96-100% de semelhança com ANAMMOX *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus, Planctomycete KSU-1 e *Candidatus* Jettenia asiatica. Um clone teve 99% de similaridade com *Pseudomonas* sp. e outros três clones apresentaram semelhança com clones não cultivados. Embora os iniciadores não foram específicos para organismos ANAMMOX, o teste de limite de detecção mostrou que com a PCR foi possível amplificar a região alvo usando até 0,3 ng de material genético. A utilização de tais ferramentas (extração de material genômico e execução de PCR com os novos iniciadores aqui desenvolvidos) mostrou-se eficiente, econômica e de fácil execução para caracterização de organismos ANAMMOX, abrindo uma gama de oportunidades para melhorar o tratamento de dejetos de suíno.

**PALAVRAS CHAVE:** Bactérias anaeróbias oxidadoras de amônio, Lagoa anaeróbia, Sequenciamento, Lodo.

### **Introdução**

A remoção biológica do nitrogênio é um importante processo biotecnológico alternativo com alta significância ecológica e econômica (Li et al., 2009). Descoberto nos anos 90, em um bioreator anóxico desnitrificante de uma planta piloto de tratamento

de efluentes (Mulder et al., 1995), a Oxidação Anaeróbia de Amônio (ANAMMOX) consiste na oxidação do amônio a gás nitrogênio ( $N_2$ ) usando nitrito como aceptor de elétrons em condições anóxicas (Jetten et al., 1999). As vantagens do ANAMMOX sobre os processos convencionais de nitrificação e desnitrificação são a redução da demanda de oxigênio e ausência de adição de carbono, assim como a diminuição da quantidade de lodo produzido (Tsushima et al., 2007).

As bactérias responsáveis pelo processo ANAMMOX pertencem ao filo Planctomycete, formando um grupo grande e filogeneticamente relacionado dentro do filo, sendo até o momento descritas *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Anammoxoglobus* e *Candidatus Jettenia* (Zhang et al., 2008). Estas têm sido encontradas em diferentes bioreatores para tratamento de efluente como bioreator de Completa remoção Autotrófica de Nitrogênio através do Nitrito (CANON) (Third et al., 2001), bioreator sequencial em batelada (SBR) (Strous et al., 1998), e outras plantas de tratamento de efluentes (Innerebner et al., 2007), mas também mostrou ter um papel significativo no ciclo do nitrogênio em ecossistemas naturais como ambiente marinho, de água doce e sedimentos (Schmid et al., 2007).

Devido ao lento crescimento, bactérias ANAMMOX não foram isoladas em culturas puras, sendo assim a utilização de tecnologias moleculares é importante para estudar bactérias ANAMMOX, bem como a diversidade na bacteriana, em ambientes relacionados a ANAMMOX.

Neste contexto, o presente estudo objetivou descrever, através de análise filogenética do 16S rRNA, a assembléia bacteriana presente em um bioreator com atividade ANAMMOX, assim como desenvolver um novo par de iniciadores para amplificar um fragmento menor tornando métodos moleculares mais fáceis, uma vez que fragmentos menores são menos frágeis, ajudando desta forma no entendimento da atividade ANAMMOX e dos organismos responsáveis por ela, abrindo um leque de oportunidades para melhorar o tratamento de dejetos.

## Material e Métodos

**Estrutura do bioreator:** O bioreator de bancada, feito de vidro, com 60 cm de altura, continha um suporte de fibra acrílica (NeT Co. LTd.) um volume de trabalho de 2,0 L, era mantido a 35°C com o auxílio de banho termostatizado e protegido da luz por cobertura de plástico preto para evitar o crescimento de algas. Schierhold Neto et al.

(2007) inocularam o bioreator com lodo do fundo de uma lagoa anaeróbia de um sistema experimental de lagoas de tratamento de dejetos suíno, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Suínos e Aves), Concórdia, SC, Brasil. O bioreator foi alimentado com meio de cultura sintético (Schierhold Neto et al., 2006), no qual continha nitrogênio nas formas 50% de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ -N) e os outros 50% amônio ( $\text{NH}_4^+$ -N), e mantido em pH 8.0. O bioreator foi acompanhado através de análise de  $\text{NH}_4^+$ -N, feita com eletrodo seletivo amônio,  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NO}_3^-$  determinados por Sistema de Análise de injeção em fluxo FIALab 2500, FIALab Instruments, com sistema de detecção espectrofotométrica, provido de fonte luminosa "LED" de tungstênio-halogênio (400 to 700 nm), fibra ótica 200 mm e detector UV/VIS USB4000 (Ocean Optics) (Schierhold Neto et al., 2006). Foram necessários 75 dias até o lodo imobilizado começar a desenvolver atividade ANAMMOX (Schierhold Neto et al., 2006).

**Amostragem e extração do material genético:** Para a amplificação do gene 16S rRNA no dia 500, uma amostra da biomassa vermelha (0,01 g ) foi coletada do bioreator, aplicada a um cartão de eluição FTA (Whatman Bioscience) sendo o material genético extraído do cartão de acordo com instruções do fabricante. A solução extraída foi misturada duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (96:4) para remover proteínas da solução, contaminantes e fenol dissolvido. Já para a amplificação da região de 436 pb o material genético foi coletado no dia 292 e foi extraído utilizando-se o método de choque-térmico onde 400  $\mu\text{L}$  de TE/TRITON 1% (10mM de Tris-EDTA pH 8.0, 1% de TRITON 100X) foram adicionados a 0,01 g da biomassa a ser processada. Seguiram-se três ciclos (10 minutos cada) alternados de fervura e congelamento (Leão et al., 1999).

**Amplificação dos fragmentos de 1500 pb e de 436 pb:** A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada usando-se primers universais conservados para eubactéria 6F (5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3') (Tchelet et al., 1999) e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991) previamente desenvolvidos. Os parâmetros para PCR foram: 2 min desnaturação inicial a 94°C seguida por 25 ciclos de (15 seg a 94°C, 30 seg a 58°C, 30 seg a 68°C).

Visando a amplificação do fragmento de 436 pb, foram desenvolvidos um iniciador direto 436F (5'-AGCGGTGAAATGCG-3') e um iniciador reverso 436R (5'-GGGTTTCGCTCGTTA -3'). O fragmento alvo localiza-se entre os nucleotídeos 677-1112 da região 16S-rRNA, tendo como base para seu desenvolvimento a sequência de nucleotídeos de *Candidatus* Brocadia anammoxidans depositada no GenBank

(AF375994). A PCR foi executada utilizando-se os seguintes parâmetros: 10 pmol de cada iniciador, 2.5 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen®), 10% de tampão 10X (Invitrogen®), 1-3 mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen®), 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatos (Invitrogen®), 3 ng do material genético a ser testado e água ultrapura completando um volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram executadas em termociclador (Mastercycler Eppendorf) como descrito a seguir: desnaturação a 94-95 °C, por 3 minutos, seguido de 25-30-35 ciclos (desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 50-60 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto) e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio (5 µg/mL; Sigma), e posteriormente visualizado sob luz UV.

**Clonagem e sequenciamento dos produtos de PCR:** Após a visualização em gel de agarose, os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit de purificação GFX PCR and Gel DNA purification kit (GE Healthcare, Giles, United Kingdom) conforme instruções do fabricante. Os produtos purificados foram ligados no plasmídeo de clonagem pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen) e posteriormente transformados em células competentes *Escherichia coli* DH5α (Sambrook e Russel 2001). Os transformantes foram semeados em meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) permitindo assim o crescimento apenas das células contendo o plasmídeo. Colônias foram escolhidas aleatoriamente e o DNA plasmidial extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001) e a presença do inserto confirmada por PCR. As sequências de nucleotídeos foram determinadas por sequenciamento com 3130xl genetic analyzer e BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

**Análise filogenética da assembléia bacteriana:** As sequências obtidas foram posteriormente alinhadas a outras sequências depositadas no GenBank utilizando-se o programa ClustalW versão 1.83 (Thompson et al., 1994) que consta no pacote do programa BioEdit versão 7.0.5 (Hall, 1999). As sequências depositadas no GenBank foram adquiridas através do programa de programa BLAST (Altschul et al., 1990). A análise filogenética foi realizada utilizando-se o programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004).

**Teste de limite de detecção e especificidade dos iniciadores:** Para testar o limite de detecção dos iniciadores desenhados, 3 ng de material genético (medidos em espectrofotômetro) extraídos de colônias de bactérias com atividade ANAMMOX, foram diluídos, ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) e submetidos a PCR e eletroforese em gel de

agarose. Para avaliar a especificidade dos iniciadores, oito DNA genômicos diferentes foram submetidos à PCR padronizada e descrita acima. Foram feitas 10 reações de PCR para cada DNA bacteriano. Os DNA genômicos molde testados pertenciam às seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica*. Como controle positivo foi utilizada amostra anteriormente positiva para bactérias ANAMMOX contendo 3 ng de material genético.

## Resultados e discussão

Durante os 560 dias de operação, o bioreator teve uma velocidade máxima de remoção de nitrogênio de 1916,6 mg NL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (no intervalo dos dias 500 a 560 de operação) que é mais alta que o processo tradicional de nitrificação/desnitrificação (300 mg NL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e quase o dobro do encontrado em bioreatores sequenciais de batelada e ‘gas-lift’ com processos ANAMMOX (1070 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (Dapena-Mora et al., 2004). No dia 292 de operação a taxa de remoção de nitrogênio era de 85% (entrada: 744.0 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; remoção: 574 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), e no dia 500 de 94% (Entrada: 1653.2 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; Remoção: 1569.9 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), sendo este último a carga máxima atingida pelo bioreator no durante os 560 dias de operação.

### Amplificação do fragmento de 436 pb

A Figura 1A mostra o resultado da padronização da PCR para a amplificação do fragmento de 436 pb apresentando bandas únicas. Para isso foram utilizados 2,0 mM de Cloreto de Magnésio, temperatura de anelamento de 60 °C e 30 ciclos. A PCR foi padronizada utilizando-se até 0,3 ng do material genético, enquanto que em outros estudos foram utilizados cerca de 30 a 80 ng (Penton et al, 2006). Isso indica que a PCR pode ser realizada com quantidades muito pequenas de DNA (Figura 1B).

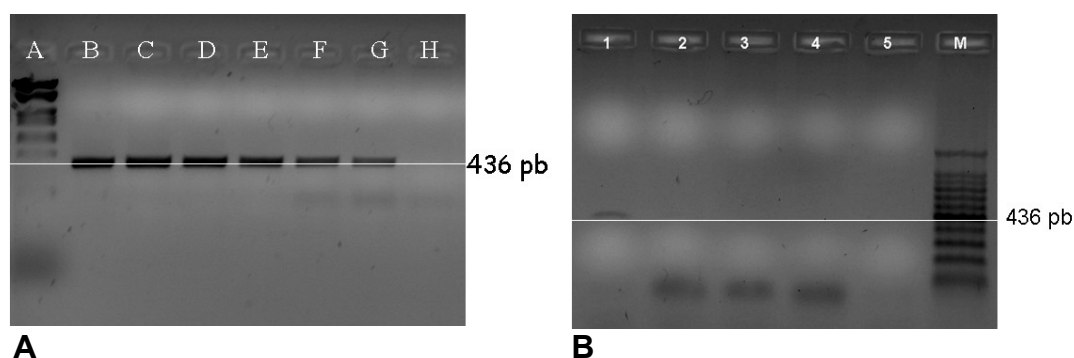


Figura 1 **A**: Padronização de PCR com novos iniciadores. **A**: marcador 100 pb; B-G amostras com 3ng de DNA; H: controle negativo. **B**: PCR com diferentes diluições do material genético para testar a sensibilidade dos iniciadores. 1: diluição  $10^{-1}$ ; 2: diluição  $10^{-2}$ ; 3: diluição  $10^{-3}$ ; 4: diluição de  $10^{-4}$ ; 5: diluição  $10^{-5}$ ; M: Marcador molecular 100pb.

Os fragmentos de 436 pb amplificados geraram 12 clones (Tabela 1), dos quais, oito (sequências GQ850472, GQ850476, GQ850473, GQ850479 e GQ850478), apresentaram identidade com organismos ANAMMOX *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus (100%), Planctomycete KSU-1 (96%), *Candidatus* Jettenia asiática (98%) (Figura 2).

Tabela 1. Identificação, sequências com identidade e % de identidade das sequências de 436 pb obtidas no presente estudo.

Sequências determinadas neste estudo	Sequências do GenBank	Ident. (%)
Clone 11(GQ850472)		
Clone 16(GQ850476)	<i>C. Anammoxoglobus propionicus</i> (EU478694)	100
Clone 13(GQ850473)	Planctomycete KSU-1 (AB057453)	96
Clone 21(GQ850479)	<i>C. Jettenia asiatica</i> (DQ301513)	98
Clone 19(GQ850478)		
	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ868767)	95
Clone 14(GQ850474)	Sulfide-oxidizing bacterium (AF393509)	95
	Swine effluent bacterium (DQ337540)	99
Clone 15(GQ850475)	Sulfide-oxidizing bacterium (AF393509)	99
	Bacterium enrichment culture (GQ162388)	99
Clone 18(GQ850477)	Uncul. Chloroflexi bacterium (EU635374)	97
Clone 7(GQ850480)	Uncul. Chloroflexi bacterium (FJ902043)	92

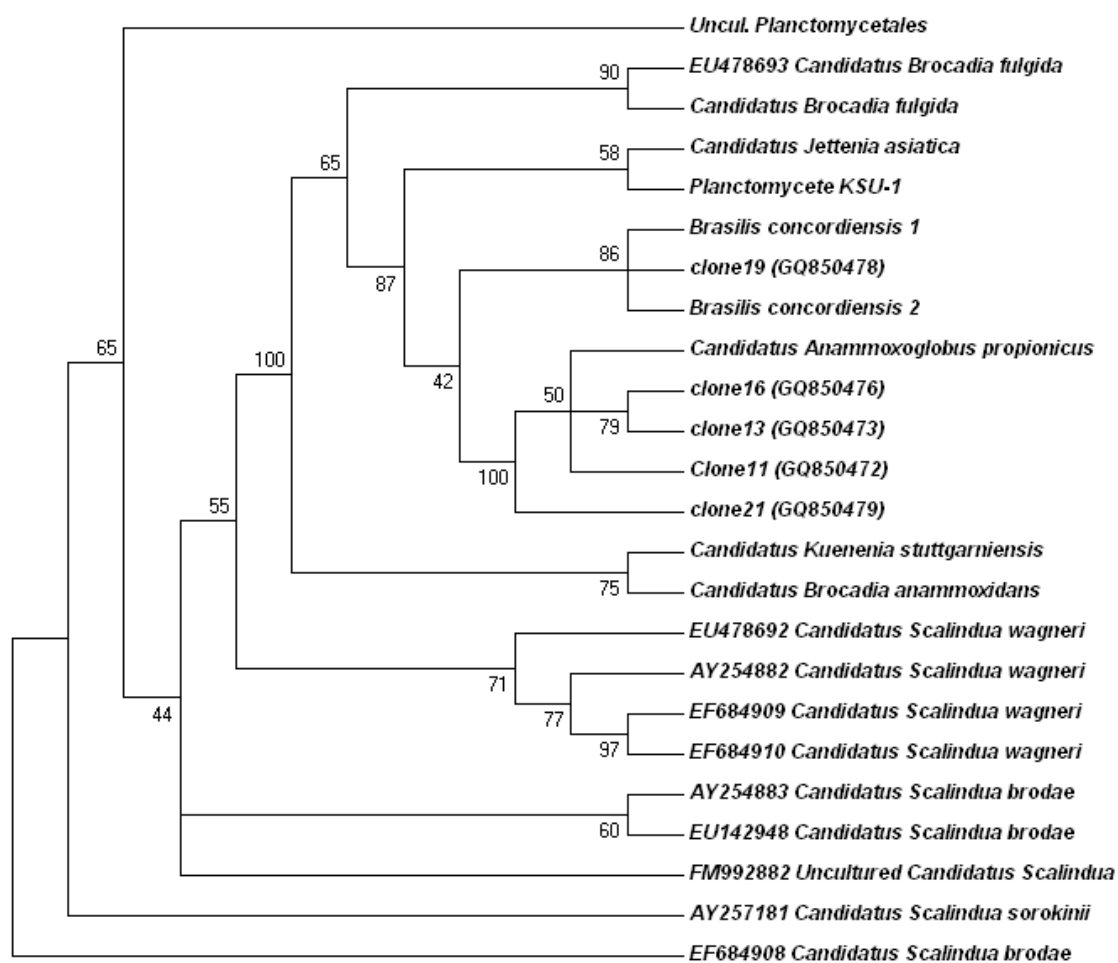


Figura 2. Dendrograma das sequências GQ850472, GQ850476, GQ850473, GQ850479 e GQ850478 e sequências semelhantes a elas depositadas no GenBank.

*Candidatus Anammoxoglobus propionicus* foi encontrada em uma cultura enriquecida oxidando propionato, acetato e formiato tendo nitrato como acepor de elétrons (Kartal et al., 2007). Esta foi a primeira bactéria ANAMMOX com nicho definido: oxidação de propionato e amônio e quando em cultura mista apresentou comportamento competitivo com outras ANAMMOX e bactérias heterotróficas desnitrificantes pela oxidação de propionato na presença de amônio, nitrito e nitrato. Após quatro meses em cultura mista, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* eliminou a outra espécie ANAMMOX (*Candidatus Brocadia anammoxidans*) do bioreator (Kartal et al., 2007).

*Planctomycete KSU-1* foi identificado como espécie bacteriana dominante em biofilme de bioreator ANAMMOX com taxa de remoção de nitrogênio total de 984 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (FUJII et al., 2002) e apresentou 92% de semelhança com *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Embora não tenha sido classificada como um organismo ANAMMOX, *Planctomycete KSU-1* possivelmente é um novo membro do gênero *Brocadia*. Em

estudos anteriores, *Candidatus Jettenia asiatica* foi descrita como bactéria dominante em um bioreator ANAMMOX de lodo granular, onde foram também encontradas bactérias pertencentes a  $\beta$ -*Proteobacteria*. A taxa de remoção de nitrogênio do bioreator foi de 800 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Quan et al., 2008) taxa essa mais baixa do que a máxima obtida no bioreator do qual se coletou a amostra do presente estudo (1916 mg NL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

Um clone (sequência GQ850474) apresentou com 95% de identidade com *Pseudomonas* sp. (Figura 3 – retângulo em destaque). Estas são bactérias desnitrificantes, que em condições anaeróbias usam nitrato como aceptor de elétrons (Jordão e Pessoa, 1995) e têm sido encontradas em bioreatores sequenciais em batelada (SBR) convertendo NO<sub>3</sub> em N<sub>2</sub> (Merzouki et al., 1999). Três clones (sequências GQ850475, GQ850477, GQ850480) apresentaram 92-99% de identidade com clones não cultivados isolados de efluente de despejo suíno.

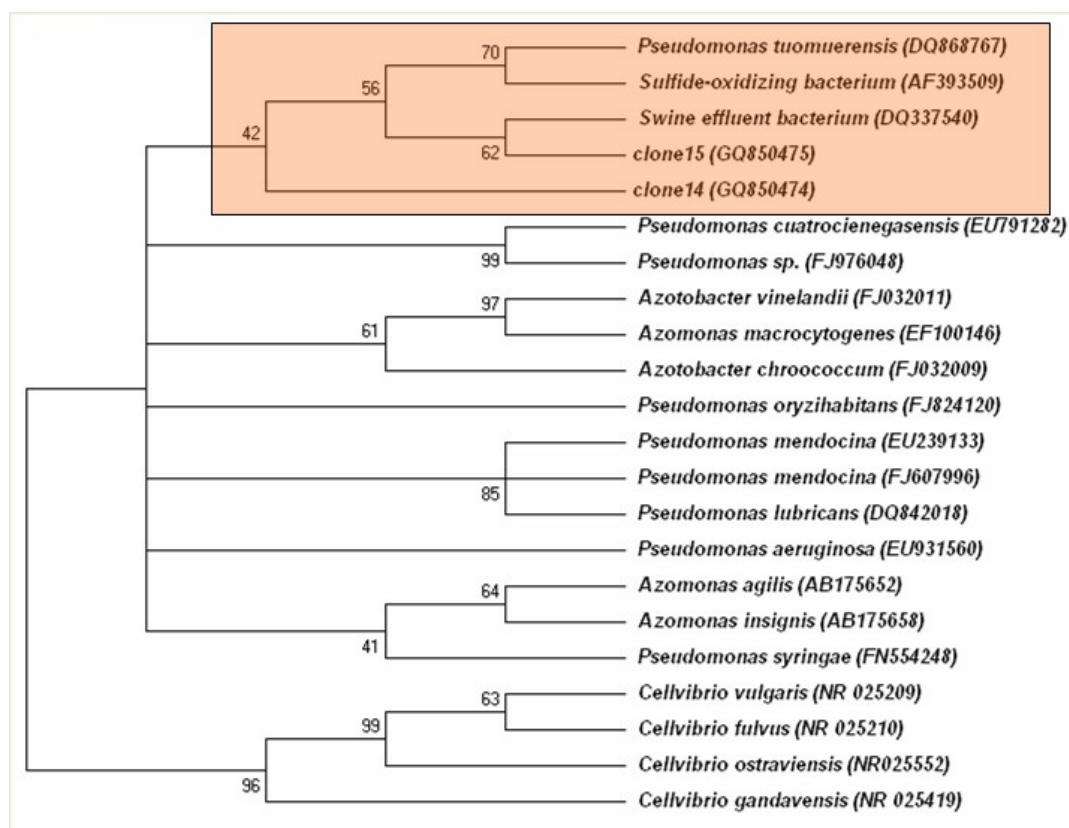


Figura 3. Dendrograma dos clones GQ850474 e GQ850475 e sequências semelhantes a eles depositadas no GenBank.

Dos 17 clones contendo o gene 16S rRNA (Tabela 2), 12 mostraram 99% de identidade com *Janthinobacterium* sp. (sequências FJ225383, FJ225384 e FJ225385), as quais são bactérias aeróbias facultativas, redutoras de nitrato, tipicamente encontradas em solos e água. Embora sejam organismos aeróbios, tais têm sido isolados



em ambientes anaeróbios e como, por exemplo, em assembléia microbiana assimiladora de amônio em sistemas de tratamento de dejetos animal (Sasaki et al., 2005).

Tabela 2. Identificação, sequências com identidade e % de identidade das sequências do gene 16S rRNA obtidas no presente estudo.

Sequências determinadas neste estudo	Sequências do GenBank	Ident. (%)
Unc. Bac. Clone KunzBRA1 (FJ225383)	Unc. Bac. Clone 300C-G04 (AY662007)	99
Unc. Bac. Clone KunzBRA2 (FJ225384)	Unc. Bac. Clone rRNA123 (AY958896)	99
Unc. Bac. Clone KunzBRA3 (FJ225385)	Unc. Bac. Clone rRNA357 (AY959130)	99
	<i>Janthinobacterium lividum</i> (DQ473538)	99
	<i>Janthinobacterium</i> sp. (EF584527)	99
Unc. Bac. Clone KunzBRA4 (FJ225386)	Unc. Bac. Clone Hot Creek (AY168745)	97
C. <i>Brasilis concordiensis</i> 1 (FJ225387)	Planctomycete KSU-1 (AB057453)	97
C. <i>Brasilis concordiensis</i> 2 (FJ225388)	<i>Candidatus</i> <i>Jettenia asiatica</i> (DQ301513)	97
Unc. Bac. Clone KunzBRA7 (FJ225389)	Unc. Bac. Clone Kas175B (EF203206)	93
	Unc. Bac. Clone: LS4-176 (AB234252)	91

Três clones (sequências FJ225387 e FJ225388) apresentaram 97% de identidade com organismos ANAMMOX Planctomycete KSU-1 e *Candidatus* *Jettenia asiatica* (DQ301513). Dois clones (sequências FJ225386 e FJ225389) tiveram 91-97% de identidade com clones não cultivados (Figura 4 – clones mostrados nos retângulos em destaque).

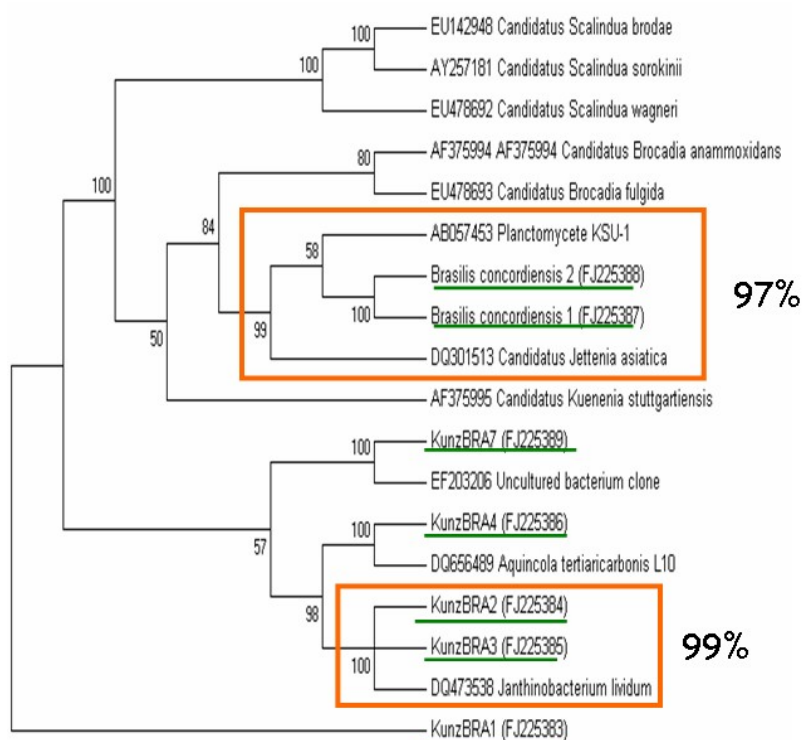


Figura 4. Dendrograma das sequências dos clones contendo o gene 16S rRNA e sequências semelhantes depositadas no GenBank.

Kartal et al. (2007) afirmam que dificilmente duas espécies ANAMMOX são encontradas no mesmo ambiente ou no mesmo bioreator. No entanto, *Candidatus Jettenia asiatica* foi detectada juntamente com *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* nos dias 292 e 500 de operação do bioreator, talvez por não se tratar de uma cultura purificada, onde diversos organismos crescem juntos.

O teste de especificidade (Figura 5) mostrou que o par de iniciadores desenvolvidos neste estudo amplificou não apenas sequências de organismos ANAMMOX, como mostra a Tabela 3, pois o número de reações positivas (representadas pelo sinal +) teve grande incidência. Contudo, nos organismos não relacionados observam-se múltiplas bandas, indicando amplificação inespecífica. Estes resultados sugerem que há a necessidade de otimizar as condições da PCR, através do aumento da temperatura de anelamento e modificação das concentrações de  $MgCl_2$  na tentativa de eliminar as amplificações inespecíficas.

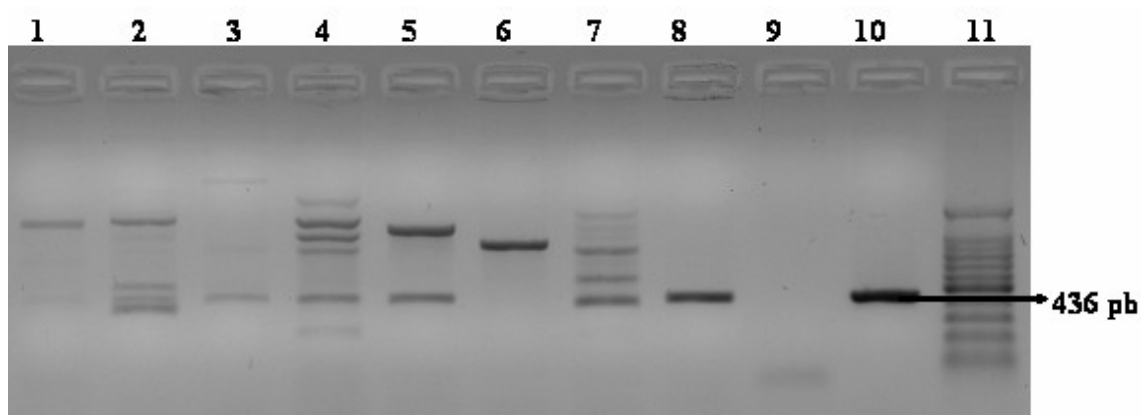


Figura 5. Resultado do teste de especificidade dos iniciadores. Teste usando DNA de 10 espécies diferentes de bactérias. 1- *Salmonella choleraesuis*; 2- *Escherichia coli*; 3- *Proteus mirabilis*; 4- *Yersinia enterocolitica*; 5- *Enterococcus faecalis*; 6- *Enterobacter* sp.; 7- *Citrobacter freundii*; 8- *Pseudomonas aeruginosa*; 9- Controle negativo; 10- Controle positivo; 11- Marcador molecular 100pb (Promega).

Tabela 3. Teste de especificidade dos iniciadores. Repetições das reações de PCR para cada bactéria. Sinal + significa resultado positivo, enquanto - significa resultado negativo.

Repetição Bactéria	R R1	R R2	R R3	R R4	R R5	R R6	R R7	R R8	R R9	R R10
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ANAMMOX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## Conclusão

O presente estudo mostrou a caracterização molecular de organismos com atividade ANAMMOX pela amplificação do gene 16S rRNA e pela padronização de técnica de PCR utilizando novos iniciadores amplificando uma região de 436 pb do 16S rRNA com apenas 3 ng de material genético. Os iniciadores não são específicos para bactérias ANAMMOX, permitindo a identificação de bactérias não-ANAMMOX que possam coexistir no bioreator. Entretanto, a presença de amplificações inespecíficas (Figura 4) demonstra que mudanças na temperatura de anelamento ( $> T$ ) e nas concentrações de reagentes da PCR devem ser realizadas, a fim de amplificar uma única banda.

Este estudo mostra que bactérias com atividade ANAMMOX que estão em vários ambientes naturais, estão também em ambientes artificiais, sendo que a grande maioria é descrita em sistemas de tratamento de lodo (Zhang et al., 2008) representando uma tecnologia poderosa e econômica no tratamento de efluentes ricos em amônia como provenientes de dejetos suínos. Adicionalmente o presente estudo mostra a primeira descrição, no Brasil, de uma assembléia bacteriana com atividade ANAMMOX em bioreator inoculado com LTDS aclimatado.

## REFERÊNCIAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J., 1990. "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Dapena-Mora, A.; Campos, J.L.; Mosquera-Corral, A.; Jetten, M.S.M.; Méndez, R.. 2004. Stability of the ANAMMOX process in a gás-lift reactor and a SBR. J. Biotechnol. 110: 159-170.

Fujii, T.; Sugino, H.; Rouse, J.D.; Furukawa, K.. 2002. Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. J. Biosci. Bioeng 94: 412–418.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 41: 95-98.

Innerebner, G.; Insam, H.; Franke-Whittle, I.H.; Wett, B.. 2007. Identification of anammox bacteria in a full-scale deammonification plant making use of anaerobic ammonium oxidation, Syst. Appl. Microbiol. 30: 408–412.

Jetten, M.S.M.; Strous, M.; Van De pas-Schoonen et al., 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. FEMS Microbiology Reviews 22: 421-43.

Jordão, E.P.; Pessoa, C.A..1995. *Tratamento de Esgotos Domésticos*. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. 3ª Edição. Rio de Janeiro.

Kartal, B.; Rattray, J.; Van Niftrik, L.A.; Van De Vossenberg, J.; Schmid, M.C.; Webb, R.I.; Schouten, S.; Fuerst, J.A.; Damsté, J.S.; Jetten, M.S.M.; Strous, M.. 2007. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic oxidizing bacteria. Syst and Appl Microbiol 30: 39-49.

Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M.. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5: 150-163.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. ed. Goodfellow, M. Chichester, UK, Wiley, 115-148

Leão, S.C.; Briones, M.R.S.; Sircili, M.P.; Balian, S.C.; Mores, N.; Ferreira-Neto, J.S.. 1999. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-Restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 37: 2592-2597.

Li, X.R.; Du, B.; Fu, H.X.; Wang, R.F.; Shi, J.H.; Wang, Y.; Jetten, M.S.M.; Quan, Z.X. 2009. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) reactor community. Systematic and Applied Microbiology 32: 278–289.

Merzouki, M.; Delgenès, J.P.; Bernet, N.; Moletta, R.; BenlemLih, M.. 1999. Polyphosphate Accumulating and Denitrifying Bacteria Isolated from Anaerobic-Anoxic and Anaerobic-Aerobic Sequencing Batch Reactors. Cur Microbiol 38: 9–17.

- Mulder A.; Van de Graaf A.A.; Robertson L.A.; Kuenen J.G.. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177–183.
- Penton, C.R.; Devol, A.H.; Tiedje, J.M.. 2006. Molecular Evidence for the Broad Distribution of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Freshwater and Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6829–6832.
- Quan, Z.; Rhee, S.; Zuo, J et al., 2008. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) reactor. *Environ Microbiol* Doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01642.x
- Sambrook, J.; Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual* Cold Spring Harbor. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, H.; Sasaki, T.; Nakai, Y.. 2005. Ammonia-assimilating microbes in the animal waste treatment systems. *J integr fiel sci.* 2: 95–106.
- SCHIERHOLT NETO, G. F. 2007. Desenvolvimento de uma Flora de Microrganismos Oxidadores Anaeróbios De Amônia Utilizando Inóculos Provenientes De Dejeito De Suíno. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – área de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos). UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Schierhold Neto, G. F.; Kunz, A.; Vanotti, M.B.; Soares, H.M.; Mattei, R.M. 2006. Aclimação e acompanhamento da atividade de lodos de efluentes de suinocultura para remoção de nitrogênio pelo processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX). In *Proc. XXX Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental*. BR 04327 219–232. Punta del Este, Uruguay. AIDIS.
- Schmid, M.C.; Risgaard-Petersen, N.; Van de Vossen- berg J.; Kuypers, M.M.M.; Lavik, G.; Petersen, J.; Hulth, S.; Thamdrup, B.; Canfield, D.; Dalsgaard, T.; Rysgaard, S.; Sejr, M.K.; Strous, M.; den Camp, H.J.M.O.; Jetten, M.S.M.. 2007. Anaerobic ammonium oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ. Microbiol.* 9: 1476–1484.
- Strous, M.; Heijnen, J.J.; Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.M.. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 596–598.
- Tchelet, R.; Meckenstock, R.; Steinle, P.; van der Meer, J.R. 1999. Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. *Biodegradation* 10: 113–125
- Third, K.A.; Sliker, A.O.; Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.M. 2002. The CANON system under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Sys. Appl. Microbiol.* 24: 588–596

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

Tsushima, I.; Kindaichi, T.; Okabe, S. 2007. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research* 41: 785-794.

Zhang, L.; Zheng, P.; Tang, C.; Jin, R. 2008. Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters. *J Zhejiang Univ Sci* 9:416-426.

### 3 DISCUSSÃO GERAL

O descobrimento do processo ANAMMOX foi importante por duas razões: a primeira, por ter mudado a figura do ciclo do nitrogênio, onde por séculos considerou-se que a amônia não poderia ser oxidada em condições anóxicas. E a segunda, por ser eficiente na remoção de amônio no tratamento de lodos (CAMP et al., 2007).

Experimentos com bioreatores têm sido feitos utilizando culturas enriquecidas ou inóculos de diferentes procedências, no intuito de entender e otimizar o processo aumentando a taxa de remoção de amônio e nitrito para que possam ser desenvolvidos sistemas ANAMMOX em escala real. No presente bioreator a taxa de remoção máxima alcançada durante os 560 dias de operação,  $1916.6 \text{ mg NL}^{-1}\text{d}^{-1}$ , é superior aos encontrados em outros estudos de bioreatores ANAMMOX:  $984 \text{ mg NL}^{-1}\text{d}^{-1}$  (FUJII et al., 2002),  $800 \text{ mg NL}^{-1}\text{d}^{-1}$  (QUAN et al., 2008),  $1070 \text{ mg NL}^{-1}\text{d}^{-1}$  (DAPENA-MORA et al., 2004).

Através das técnicas moleculares aplicadas no presente estudo, detectou-se no bioreator bactérias aeróbias semelhantes às pertencentes ao filo  *$\beta$ -proteobacteria*, as quais já foram encontradas em outros bioreatores juntamente com bactérias ANAMMOX (QUAN et al., 2008). Também foram encontradas bactérias anaeróbias semelhantes as já descritas ANAMMOX *Candidatus* Jettenia asiatica e *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus, além de bactérias similares a Planctomycete KSU-1, sendo essas as responsáveis pela remoção do amônio do bioreator.

Kartal et al. (2007) afirmam que dificilmente duas espécies ANAMMOX são encontradas no mesmo ambiente ou no mesmo bioreator. No entanto, *Candidatus* Jettenia asiatica foi detectada juntamente com *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus nos dias 292 e 500 de operação do bioreator, talvez por não se tratar de uma cultura purificada, onde diversos organismos crescem juntos.

Penton et al. (2006) também desenvolveram um par de iniciadores amplificando uma região de 700 pb do gene 16S rRNA, no entanto esses iniciadores eram específicos para bactérias ANAMMOX, o que não permite amplificar organismos que estejam co-existindo no bioreator. O par de iniciadores desenvolvidos no presente estudo, amplificando 436 pb, tem o diferencial de amplificar um fragmento menor do gene 16S rRNA, o que aumenta o sucesso da clonagem e do sequenciamento, uma vez que quanto

maior o fragmento, mais difícil se torna a manipulação do mesmo. Ademais, a PCR padronizada permite a amplificação de organismos não-ANAMMOX que estejam co-existindo no bioreator e também a amplificação de material genético de outras bactérias com diferenciado perfil eletroforético. No entanto, deve-se realizar mais testes no intuito de aumentar a especificidade dos iniciadores em amplificar somente o fragmento de 436 pb.

Além disso, foi possível executar a PCR aqui padronizada utilizando-se até 0,3 ng de material genético molde, enquanto que em outros estudos foram utilizados cerca de 30 a 80 ng (PENTON et al., 2006). Isso indica que a PCR pode ser realizada com quantidades muito pequenas de material genético.

Bactérias com atividade ANAMMOX existem em vários ambientes naturais e artificiais. Muitos estudos têm encontrado ANAMMOX em ambiente marinho em diferentes locais do mundo, mas a grande maioria ainda é descrita em sistemas de tratamento de lodo (ZHANG et al., 2008). Embora o processo seja promissor no tratamento de lodos, organismos responsáveis por ele ainda não são totalmente conhecidos.

Desta forma, o aprimoramento das metodologias de caracterização descritas neste estudo contribui para a detecção rápida e acompanhamento do comportamento da assembléia bacteriana com atividade ANAMMOX. Podendo ser aplicado a ambientes naturais servindo ao estudo complementar do ciclo do nitrogênio. Sugere-se ainda, um monitoramento mais frequente de bioreatores com culturas não purificadas, para a elucidação sobre organismos associados a ANAMMOX e também a co-ocorrência de diferentes gêneros de bactérias ANAMMOX.



#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al.; TERMIGNONO, C. et al. (Trad.). **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto alegre: ArtMed, 1999. 757 p.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- AMANN R.I.; LUDWIG W.; SCHLEIFER K.H. 1995. **Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation**. Microbiol Rev. 59: 143–169.
- BRESSAN, C.R. 2007. **Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.
- CAMP, H.J.M.O. DEN; JETTEN, M.S.M.; STROUS M. 2007. ANAMMOX. In: Bothe, H.; Ferguson, S.J.; Newton W.E. (Edi) **Biology of the Nitrogen Cycle**. Elsevier. 2007. 451p.
- CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente, **Resolução Nº 357** de 18/03/2005, *Diário Oficial da União*, 19/03/2005.
- DAPENA-MORA, A.; CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; JETTEN, M.S.M.; MÉNDEZ, R. 2004. **Stability of the ANAMMOX process in a gás-lift reactor and a SBR**. J. Biotechnol. 110: 159-170.
- DIJKMAN, H.; STROUS, M. 1999. **Process for ammonia removal from wastewater**. Patent PCT/NL 99/00446.
- EGLI, K.; FANGER, U.; ALVAREZ, P.J.J.; SIEGRIST, H.; VAN DER MEER, J.R.; ZEHNDER, A.J.B. 2001. **Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate**. Arch. Microbiol. 175:198-207.
- ENGSTRÖM, P.; DALSGAARD, T.; HULTH, S.; ALLER, C.R. 2005. **Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): implications for N<sub>2</sub> production in coastal marine sediments**. Geochim. Cosmochim. Acta 69: 2057-2065.
- ETCHEBEHERE, C. e MENES, R.J. 2005. Caracterização, Monitoramento e Controle de Processos: Técnicas de Caracterização Microbiológica. In: **V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos**. Florianópolis. 18 p.
- FUJII, T.; SUGINO, H.; ROUSE, J.D; FURUKAWA, K. 2002. **Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier**. J. Biosci. Bioeng 94: 412–418.

HALL, T. A. 1999. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** 41: 95-98.

HARRISON, C.J. e LANGDALE, J.A. 2006. **A step by step guide to phylogeny reconstruction.** The Plant . 45: 561–572.

HELLINGA, C.; SCHELLEN, A.A.J.C.; MULDER, J.W.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. (1998) **The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich wastewater.** *Water Science Technology.* 37:135-142.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006: Resultados Preliminares. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) acesso em 02.07.2009.

INNEREBNER, G.; INSAM, H.; FRANKE-WHITTLE, I.H.; WETT, B. 2007. **Identification of anammox bacteria in a full-scale deammonification plant making use of anaerobic ammonia oxidation,** *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 408–412.

ISAKA, K.; DATE, Y.; SUMINO, T.; YOSHIE, S.; TSUNEDA, S. 2005. **Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 70: 47-52.

JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN et al., 1999. **The anaerobic oxidation of ammonium.** *FEMS Microbiol Rev.* 22: 421-43.

JETTEN, M. S. M.; VAN DONGEN, L. G. J. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.. **The Combined Sharon/Anammox Process.** Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. London. 2001.

JETTEN, M.S.M.; SCHMID, M.; SCHMIDT, I.; WUBBEN, M.; DONGEN, U. VAN; ABMA, W.; SLIEKERS, O.; REVSBECH, N.P.; BEAUMONT, H.J.E.; OTTOSEN, L.; VOLCKE, E.; LAANBROEK, H.J.; CAMPOS-GOMEZ, J.L.; COLE, J.; LOOSDRECHT, M. VAN; MULDER, J.W.; FUERST, J.; RICHARDSON, D.; PAS, K. VAN DE; MENDEZ-PAMPIN R.; THIRD, K.; CIRPUS, I.; SPANNING, R. VAN; BOLLMANN, A.; NIELSEN, L.P.; OP DEN CAMP, H.; SCHULTZ, C.; GUNDERSEN, J.; VANROLLEGHEM, P.; STROUS, M.; WAGNER, M.; KUENEN, J.G. 2002. **Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria.** *Reviews in Environmental Science & Biotechnology* 1: 51–63.

JETTEN, M.S.M.; CIRPUS, I.; KARTAL, B.; NIFTRIK, L. VAN; PAS-SCHOONEN, K.T. VAN DE; SLIEKERS, O.; HAAIJER, S.; STAR, W. VAN DER; SCHMID, M.; VOSSENBERG, J. VAN DE; SCHMIDT, I.; HARHANGI, H.; LOOSDRECHT, M. VAN; KUENEN, J. G.; CAMP H. OP DEN; STROUS M. 2004. **1994–2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium.** *Bioch Socia Transac* 33: 119-123.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A. 1995. **Tratamento de Esgotos Domésticos.** Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. 3ª Edição. Rio de Janeiro.

KARTAL, B., RATTRAY, J., NIFTRIK, L. A. VAN., VOSSENBERG, J. VAN DE., SCHMID, M. C., WEBB, R. I., SCHOUTEN, S., FUERST, J. A., DAMSTÉ, J. S., JETTEN, M. S. M., STROUS, M., 2007. ***Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic oxidizing bacteria.*** Syst and Appl Microbiol 30, 39-49.

KARTAL, B., VAN NIFTRIK, L., SLIEKERS, O., SCHMID, M.C., SCHMIDT, I., VAN DE PAS-SCHOONEN, K., CIRPUS, I., VAN DER STAR, W., VAN LOOS-DRECHT, M., ABMA, W., *et al.*, 2004. **Application, ecophysiology and biodiversity of anaerobic ammonium oxidizing bacteria.** Rev. Environ. Sci. Biol./Technol., 3(3):255-264.

KHIN, T. e ANNACHHATRE, A.P. 2004. **Novel microbial nitrogen removal processes.** Biotechnology Advances. 22: 519 - 532.

KNOCHE, K.; KEPHART, D. Cloning blunt-end Pfu DNA polymerase-generated PCR fragments into pGem®-T vector systems. *Promega Notes Magazine*, n. 71, p. 10-13, 1999. Promega Corporation.

KOBS, G. **pGem®-T vector: cloning of modified blunt-ended DNA fragments.** Promega Notes Magazine, n 55, p. 28-29, 1996. Promega Corporation.

KREUZER, H. **Engenharia genética e biotecnologia.** 2.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2002.

KUENEN, J. G. 2008. **Anammox bacteria: from discovery to application.** Nature. 6: 320-326.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M., 2004. **MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment.** Brief. Bioinform. 5: 150-163.

KUNZ, A. 2009. **TRANSFORMATION OF ANIMAL PRODUCTION IN BRAZIL AND ITS ENVIRONMENTAL IMPACTS.** In: I Simpósio Internacional sobre gerenciamento de resíduos de animais, Florianópolis.

KUYPERS, M. M., G. LAVIK, D. WOEBKEN, M. SCHMID, B. M. FUCHS, R. AMANN, B. B. JORGENSEN, AND M. S. JETTEN. 2005. **Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 6478–6483.

KUYPERS, M.M.M., SLIEKERS, A.O., LAVIK, G., SCHMID, M., JORGENSEN, B.B., KUENEN, J.G., SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S., STROUS, M., JETTEN, M.S.M., SCHMIDT, I., 2003. **Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the black sea.** Nature. 422: 608-611.

LANE, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.** ed. Goodfellow, M. Chichester, UK, Wiley, 115-148.

LEÃO, S. C.; BRIONES, M. R. S.; SIRCILI, M. P.; BALIAN, S. C.; MORES, N.; FERREIRA-NETO, J. S. 1999. **Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-Restriction enzyme analysis.** J. Clin. Microbiol. **37**: 2592-2597.

LEWIN, B. **GENES VII**. New York: Oxford University Press, 2000. 990 p.

LI X.R., DU B., FU H.X., WANG R.F., SHI J.H., WANG Y., JETTEN M.S.M., QUAN Z.X., 2009. **The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) reactor community.** System. App. Microb. **32**, 278–289.

LINDSAY, M. R., R. I. WEBB, M. STROUS, M. S. M. JETTEN, M. K. BUTLER, R. J. FORDE, e J. A. FUERST. 2001. **Cell compartmentalisation in lanctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell.** Arch. Microbiol. **175**:413–429.

MARTINS, T. H. 2007. **Enriquecimento de Consórcios Microbianos em Químioestatos Sob Condições ANAMMOX.** Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento – área de Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

MERZOUKI, M., DELGENÈS, J.P., BERNET, N., MOLETTA, R., BENLEMLIH, M., 1999. **Polyphosphate Accumulating and Denitrifying Bacteria Isolated from Anaerobic-Anoxic and Anaerobic-Aerobic Sequencing Batch Reactors.** Cur Microbiol **38**, 9–17.

MULDER A., VAN DE GRAAF A.A., ROBERTSON L.A., KUENEN J.G., 1995. **Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor.** FEMS Microbiol. Ecol. **16**, 177–183.

NEI, M. e KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics.** Oxford Univ. Press, 2000.

Palhares J. C. P. e Calijuri M.C. (2007). **Caracterização dos afluentes e efluentes suínícolos em sistemas de crescimento/terminação e qualificação de seu impacto ambiental.** *Ciência Rural*. **37** (2): 502-509.

PRATES, K.V.M.C. **Verificação da Produção Biológica de Nitrogênio a Partir de Lodos Anaeróbios Granulados Cultivados em Meio Contendo Nitrogênio amoniacal e Baixas Concentrações de Compostos Orgânicos**”. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 1997.

PENTON, C.R.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. 2006. **Molecular Evidence for the Broad Distribution of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Freshwater and Marine Sediments.** Appl. Environ. Microbiol. **72**: 6829-6832.

QUAN, Z.; RHEE, S.; ZUO, J.; YANG, Y.; BAE, J.; PARK, J.R.; LEE, S.; PARK, Y., 2008. **Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) reactor.** Environ. Microbiol. 10.1111/j.1462-2920.2008.01642.x

RYSGAARD, S., GLUD, R.N., RISGAARD-PETERSEN, N., AND DALSGAARD, T. 2004. **Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments**. *Limnol Oceanogr* 49: 1493–1502.

RISGAARD-PETERSEN, N., MEYER, R.L., SCHMID, M., JETTEN, M.S. M., ENRICH-PRAST, A., RYSGAARD, S., AND REVSBECH, N.P. (2004) **Anaerobic ammonium oxidation in an estuarine sediment**. *Aquat Microb Ecol* 36: 293–304.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W., 2001. **Molecular Cloning: A laboratory Manual Cold Spring Harbor**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SASAKI H, SASAKI T, NAKAI Y (2005) **Ammonia-assimilating microbes in the animal waste treatment systems**. *J integr fiel sci*. 2: 95-106.

SCHIERHOLT NETO, G. F. 2007. **Desenvolvimento De Uma Flora De Microrganismos Oxidadores Anaeróbios De Amônia Utilizando Inóculos Provenientes De Dejeito De Suíno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – área de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos). UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHIERHOLD NETO, G. F., KUNZ, A., VANOTTI, M.B., SOARES, H.M., MATTEI, R.M., 2006. **Aclimação e acompanhamento da atividade de lodos de efluentes de suinocultura para remoção de nitrogênio pelo processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX)**. In *Proc. XXX Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental*. BR 04327 219-232. Punta del Este, Uruguay. AIDIS.

SCHMIDT, I., HERMELINK, C., VAN DE PAS-SCHOONEN, K., STROUS, M., OP DEN CAMP, H. J., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. 2002. **Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NOx) by two different lithotrophs**. *Appl Environ Microbiol* 68, 5351–5357.

SCHMID M.C., RISGAARD-PETERSEN N., VAN DE VOSSEN- BERG J., KUYPERS M.M.M., LAVIK G. , PETERSEN J., HULTH S., THAMDRUP B., CANFIELD D., DALSGAARD T., RYSGAARD S., SEJR M.K., TROUS M.S, DEN CAMP H.J.M.O., JETTEN M.S.M., 2007. **Anaerobic ammonium oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity**. *Environ. Microbiol.* 9, 1476–1484.

SCHMID, I.; SLIEKERS, O; SCHMID, M.; BOCK, E. ; FUERST, J.A.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. 2003. **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater**. *FEMS Microbiol.* 27: 481-492.

SHUMAN, S. 1994. **Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase**. *J. Biol. Chem.* 269, 32678-32684.

SLIEKERS, A.O.; DERWORT, N.; CAMPOS GOMEZ, J.L.; STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. 2002. **Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor**. *Water Research*, 36: 2475-2482.

STACKEBRANDT, E., W. LIESACK, AND B. M. GOEBEL. 1993. **Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis.** *FASEB J.* 7:232–236.

STROUS, M.; FUERST J.; KRAMER, E.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; PAS-SCHOONEN, K. T. van de; WEEB, R.; KUENEN, J. G.; JETTEN M. S. M. 1999. **Missing lithotroph identified as new planctomycete.** *Nature.* 400:446–449.

STROUS, M.; HEIJNEN, J.J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M., 1998. **The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium – oxidizing microorganisms.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 589-596.

TAL, Y; WATTS, J.E.M.; SCHREIER, H.J. 2006. **Anaerobic Ammonium-Oxidizing (ANAMMOX) Bacteria and Associated Activity in Fixed-Film Biofilters of a Marine Recirculating Aquaculture System.** *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2896-2904.

TCHELET, R., MECKENSTOCK, R., STEINLE, P., VAN DER MEER, J. R. (1999) **Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge.** *Biodegradation* 10, 113-125.

THAMDRUP, B., AND DALSGAARD, T. 2002. **Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments.** *Appl Environ Microbiol* 68:1312–1318.

THIRD, K.A; SLIEKER, A.O; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. 2002. **The CANON system under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria.** *Sys. Appl. Microbiol.* 24: 588–596

TOH, S.K., WEBB, R.I., ASHBOLT, N.J. 2002. **Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters.** *Microb Ecol.* v. 43. p. 154-167.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nuc. Acid. Res.* 22: 4673-4680.

TRIMMER, M., NICHOLLS, J.C., AND DEFLANDRE, B. 2003. **Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom.** *Appl Environ Microbiol* 69: 6447–6454.

TSUSHIMA, I., KINDAICHI, T., OKABEA, S., 2007. **Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR.** *Water Research* 41, 785-794.

YE, R.W.; THOMAS, S.M.. 2001. **“Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and application”.** *Current Opinion in Microbiology*, 307-312.

VAN DE GRAAF, A.A.; BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN M.S.M.;

KUENEN, J.G. (1996) **Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor.** *Microbiology*. vol 142. p. 2187 a 2196.

VAN DER STAR ,W.R.L.; ABMA W.R.; BLOMMERS, D.; MULDER J.W.; TOKUTOMI T.; STROUS M.; PICIOREANU C.; VAN LOOSDRECHT M.C.M. (2007). **Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam.** *Water Research*. 41: 4149 – 4163.

VAN KEMPEN, R., MULDER, J.W., UIJTERLLNDE C.A. 2001. **Overview: Full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering.** *Water Sci. Technol.* 44: 145-152.

VAN NIFTRIK, L., GEERTS, W.J.C., VAN DONSELAAR, E.G., HUMBEL, B.M., WEBB, R.I. FUERST, J.A., VERKLEIJ, A.J., JETTEN, M.S.M., AND STROUS, M. (2008) Linking Ultrastructure and Function in Four Genera of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Cell Plan, Glycogen Storage, and Localization of Cytochrome *c* Proteins. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 708–717.

WOEBKEN D, LAM P, KUYPERS MMM et al .2008. **A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel Candidatus Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones.** *Env Microbiol* 10: 3106–3119

ZHANG, L., ZHENG, P., TANG, C., JIN, R., 2008. **Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters.** *J Zhejiang Univ Sci B* 9, 416-426.

## **ANEXOS**



*Anexo 1: Meio de cultura sintético utilizado na alimentação do bioreator.*

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (mmol/L)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
KHCO <sub>3</sub>	1,25	125*
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,19	27
FeSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,06	9
EDTA	0,01	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,99	240
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,29	143
NH <sub>4</sub> Cl	Conforme a progressão de carga	
NaNO <sub>2</sub>	Conforme a progressão de carga	
	0,3 ml/L-1 da solução de microelementos	

\*Entre o dia 208 e 268, essa concentração foi elevada progressivamente até 500 mg/L.

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (mmol/L)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
ZnSO <sub>4</sub>	7,72	1247
MnSO <sub>4</sub>	7,61	1149
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,27	44
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .14H <sub>2</sub> O	0,59	201,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,63	129
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,23	30
KCl	1,34	100
EDTA	2,600	975

Fonte: SCHIERHOLT NETO et al., (2006).

*Anexo 2: Metodologia utilizada nas análises de compostos nitrogenados presentes no bioreator*

- Nitrito: Na determinação de nitrito optou-se por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA, 1995, modificado segundo SCHIERHOLT NETO et al., (2006). Foi utilizado um Sistema Multicanal FIALab – 2500. Cabos de fibra ótica SMA 200 mm, que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000 - escala ótica de 200 a 850 nm). Lâmpada de halogênio de quartzo. Reagente de cor: Sulfanilamida, Ácido Ortofosfórico e N\_1\_naftiletilenodiamina dihidracloroeto, sendo todo reagente grau P.A.

O  $\text{NO}_2^-$  é determinado através da formação de um azo composto púrpura ( $\lambda_{\text{max}}$  em 540 nm) produzido pelo acoplamento entre o seu respectivo sal de diazônio, derivado da sulfanilamida, com N-(1-naftil)-etilediamina diidrocloreto, sendo que a faixa de aplicação do método é de 0,015 a 2  $\text{mg/L}^{-1}$  de N- $\text{NO}_2^-$ . A curva padrão é preparada a partir de soluções padrões de  $\text{NaNO}_2$ . As amostras eram diluídas com água deionizada até atingir uma concentração dentro da faixa de aplicação.

-Nitrato: Na determinação de nitrato também se optou por utilizar o método colorimétrico em um sistema de análise por injeção em fluxo conforme APHA, 1995, modificado segundo SCHIERHOLT NETO, et al., (2006). Foi utilizado um Sistema Multicanal FIALab – 2500. Cabos de fibra ótica SMA 200 mm, que ligam a célula de reação ao espectrofotômetro (Ocean-optics S2000). Lâmpada de halogênio de quartzo. Uma coluna com 5g de cádmio. Solução tampão: Cloreto de Amônio e EDTA Sal Dissódico. Reagente de cor: Sulfanilamida, Ácido Ortofosfórico e N\_1\_naftiletilenodiamina dihidracloroeto, sendo todo reagente grau P.A.

Para a análise de nitrato a amostra, juntamente com a solução tampão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 8,5), passa por uma coluna de cádmio, onde todo o nitrato é reduzido a nitrito. O  $\text{NO}_2^-$  é determinado através da formação de um azo composto púrpura ( $\lambda_{\text{max}}$  em 540 nm) produzido pelo acoplamento entre o seu respectivo sal de diazônio, derivado da sulfanilamida, com N-(1-naftil)-etilediamina diidrocloreto, sendo que a faixa de aplicação do método é de 0,04 a 10  $\text{mg/L}^{-1}$  de N- $\text{NO}_3^-$ , sendo a curva padrão preparada a partir de soluções padrões de  $\text{KNO}_3$  e as amostras eram diluídas com água deionizada até atingir uma concentração dentro da faixa de aplicação. A concentração de nitrato é obtida pela diferença da análise da mesma amostra com e sem a coluna de cádmio.

- Nitrogênio amoniacal total: Para determinação de nitrogênio amoniacal total, utilizou-se o método de destilação e titulação (método 4500- $\text{NH}_3$ -B, segundo APHA, 1995). Utilizou-se um conjunto para destilação, destilador TECNAL – TE-036/1, um pHmetro MICRONAL B474 e um titulador semi-automático TITRONIC T-200. Para a análise, se fez necessário preparar as seguintes soluções: Ácido sulfúrico 0,025  $\text{mol/L}^{-1}$  (devidamente padronizado através de destilação de solução de Hidroximetil amino metano); Óxido de magnésio;  $\text{NaOH}$  10  $\text{mol/L}^{-1}$ ; Solução mista de Ácido Bórico

(indicador vermelho de metila, verde de bromocresol, indicador de ácido bórico e NaOH 0,05 mol/L<sup>-1</sup>, todos devidamente misturados e homogeneizado).

Destilou-se 10 mL da amostra, sendo o destilado recolhido em 8 mL de solução mista de ácido bórico. A amônia do destilado é determinada titulometricamente (até pH 4.2) com ácido sulfúrico 0,025 mol/L<sup>-1</sup>. Sendo que o valor da amônia é determinado pela equação:

$$\text{mg N - NH}_3 \cdot \text{L}^{-1} = \frac{2 \times (A - B) \times M \times 14000}{V}$$

Onde:

A = Volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> usado na titulação da amostra (mL);

B = Volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> usado na titulação do branco (mL);

M = Molaridade do ácido (mol.L<sup>-1</sup>);

V = Volume de amostra (mL).